



Universidade dos Açores

Departamento de Ciências Agrárias

**Avaliação da Criopreservação e posterior
Capacidade Fecundante de Sémen de Touro
da Raça Brava a partir da recolha
Post-Mortem**

José Paulo Rodrigues Pacheco Lima

Orientadores:

Prof. Joaquim Fernando Moreira da Silva

Dr. António Eduardo Nobre Chaveiro

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo

2014

Dedico este trabalho à minha mãe pelo empenho na formação dos filhos.

Agradecimentos

- Aos meus orientadores, professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva e Doutor António Chaveiro, pela sua pronta disponibilidade, incentivo, material facultado e conhecimentos ministrados. A forma como se envolveram na execução deste trabalho, nas suas diferentes fases, foi fundamental para o sucesso do mesmo.

- Aos ganaderos e proprietários de vacas bravas, que puseram à disposição os seus animais para a realização das várias etapas que constituíram este trabalho. O esforço, neste maneio pouco usual para este tipo de raça bovina, abrem a porta para o futuro no que diz respeito à ganadaria brava na Ilha Terceira.

- Ao meu Tio João Pacheco de Lima, pelos conhecimentos ministrados no que diz respeito à técnica de Inseminação Artificial. Acompanhou-me às práticas em matadouro várias vezes, fato importante na execução deste trabalho.

- Aos meus pais e irmãos pelo seu permanente incentivo.

- Á minha esposa por todo o seu constante apoio e paciência.

Resumo

A raça brava apresenta um conjunto de singularidades que dificultam a utilização de técnicas de reprodução assistida nesta raça bovina. No presente trabalho, e pela primeira vez nos Açores, foi avaliada a capacidade de fertilização de sémen de touro bravo, obtido a partir do epidídimo após abate dos animais, com vista à sua congelação e posterior utilização em inseminação artificial (I.A.).

Para a obtenção do sémen, 6 touros de raça brava foram selecionados, tendo o sémen sido recolhido a partir do epidídimo após o abate dos animais no matadouro, sendo que três foram abatidos após a lide em praça e três sem terem sido lidados. O sémen foi congelado na Universidade dos Açores e posteriormente utilizado em testes laboratoriais para aquilatar a sua qualidade, complementados com 14 inseminações artificiais *in vivo* em explorações da raça brava na Ilha Terceira.

As análises laboratoriais avaliaram a motilidade por microscopia ótica de contraste de fase e por citometria de fluxo, a vitalidade e integridade da membrana plasmática (usando a técnica de coloração dupla com os fluorocromos PI e SYBR-14) e a vitalidade e integridade acrossómica (usando os fluorocromos PI e FITC-PSA). Para a análise estatística foi realizada uma análise de variância simples ANOVA, para avaliar os efeitos dos diferentes fatores. Quando a ANOVA revelou um efeito significativo ($P < 0,05$) os resultados foram comparados pelo teste de Tukey.

Observou-se que os espermatozoides colhidos do epidídimo possuíam, em média, uma viabilidade de 43,0 %, podendo ser usados em várias biotecnologias com resultados satisfatórios. Em relação à motilidade e qualidade do movimento observou-se que a percentagem de motilidade espermática (57,1%) não afetou a taxa de sucesso na IA (50,0%). O sémen do touro E, que apresentou 60% de motilidade, obteve resultados

negativos na primeira IA enquanto o sémen do touro F, que teve uma menor percentagem de motilidade (20,0%), apresentou um resultado positivo à IA.

Em relação à viabilidade espermática, em média 57.1% dos espermatozoides foram considerados ativos, variando de 45% para os touros A e F para 68% para os touros B e E.

No que diz respeito à IA verificamos que apenas o touro C não gerou uma gestação, apesar da taxa de concepção poder ter sido influenciada por diversos fatores inerentes ao reprodutor (genótipo, idade, lide ou não lide), bem como às fêmeas (deteção de cio, protocolo de sincronização de estro, condição corporal, inseminador).

Para além dos conhecimentos adquiridos concluiu-se que a realização de mais estudos, no que diz respeito à reprodução da raça brava, será fundamental para ampliar a informação existente.

Palavras-chave: Raça brava, Touro, Sémen, Inseminação artificial, Epidídimo.

Abstract

The fighting breed cattle present a set of singularities that hinder the use of assisted reproduction techniques in this bovine species. In the present study, and for the first time in the Azores, it was analyzed the fertilizing capacity of semen of bull fighting sires, obtained from the epididymis after slaughter of the animals, with a view to freezing and later use in artificial insemination (I.A.).

To obtain the semen, six fighting bulls were selected, and the semen was collected from epididymis after the slaughter of animals: three of which were slaughtered after Lydia and three without being handled. The semen was frozen at the University of the Azores and later used in laboratory tests to assess their quality, complemented with 14 artificial inseminations (A.I) *in vivo* explorations of the fighting breed cattle in Terceira Island.

Laboratory tests evaluated the motility by optical phase contrast microscopy. Membrane integrity was evaluated by flow cytometry (using the technique of double coloration with SYBR-14 and PI fluorochromes) and the vitality and acrosome integrity (using PI and FITC-PSA) fluorochromes. For statistical analysis, one simple analysis of variance ANOVA was performed to evaluate the effects of different factors. When ANOVA revealed a significant effect ($P < 0.05$) results were compared by Tukey test.

It was found that the sperm collected from the epididymis can be used in various biotechnology with satisfactory results. Regarding the quality of movement and motility, it was observed that the percentage of sperm motility, on average 43.0%, did not affect the success rate IA. Semen of bull E showed 60% motility, was negative in the first IA while the semen of the bull F, had a lower percentage of motility (20%) showed a positive result for IA.

Regarding sperm's viability, on average 57.1% of sperm was considered as active, ranging from 45.0% for bulls A and F to 68.0 % for bulls B and E.

With regard to IA it has been observed that only the bull C did not generated a gestation, although the rate of conception could have been influenced by various factors inherent to the bull such as genotype or age and the female such as estrus detection, estrus synchronization protocol, body condition and the inseminator, among others.

In addition to the acquired knowledge it was concluded that further studies, with regard to the reproduction of bullfighting breed will be critical to extend the existing information.

Key Words: Fighting breed, Bull, Semen, Artificial Insemination, Epididymis.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
células/ml	Células por ml
cm	Centímetros
eventos/s	Eventos por segundo
g/l	Gramas por litro
Hz	Hertz
M	Molar
mg/ml	Miligramas por mililitro
min.	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mW	Megawatt
n	Amostra
nm	Nanómetro
°C	Centígrados
P	Nível de significância
Xs	Vezes
µl	Microlitros

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Índice.....	ix
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica.....	4
2 Reprodução na Raça Brava	4
2.1 Reprodução no Touro Bravo.....	4
2.1.1 Anatomia do Sistema Reprodutor do Touro	4
2.1.1.1 Testículos.....	4
2.1.1.2 Epidídimo.....	6
2.1.1.3 Dutos Eferentes e Canal Epidídimário.....	6
2.1.1.4 Glândulas Acessórias.....	7
2.1.1.4.1 Vesículas Seminais.....	8
2.1.1.4.2 Glândulas Bulbouretrais	8
2.1.1.4.3 Próstata.....	8
2.1.1.5 Órgãos de Evacuação de Sémen.....	9
2.1.1.5.1 Conduto Deferente.....	9
2.1.1.5.2 Uretra.....	9
2.1.1.5.3 Pénis.....	10
2.1.2 Fertilidade no Touro	10
2.1.3 Controlo Fisiológico da Reprodução no Macho.....	11
2.2 Reprodução na Vaca Brava.....	12

2.2.1	Anatomia do Sistema Reprodutor da Fêmea Bovina Brava.....	12
2.2.1.1	Vulva.....	13
2.2.1.2	Vagina.....	13
2.2.1.3	Cérvix.....	14
2.2.1.4	Útero.....	14
2.2.1.5	Ovidutos.....	15
2.2.1.6	Ovários.....	15
2.2.2	Fertilidade na Fêmea Bovina Brava.....	16
2.2.3	Controlo fisiológico da Reprodução da Fêmea Bovina.....	18
2.3	Criopreservação de Sémen Recolhido do Epidídimo.....	21
2.3.1	Uso dos Espermatozoides do Epidídimo.....	21
2.3.2	Criopreservação a partir do Epidídimo.....	23
2.4	Avaliação das Caraterísticas Físicas e Morfológicas do Espermatozoide.....	24
2.4.1	Avaliação da Motilidade Espermática.....	25
2.4.2	Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática Acrossomal e Capacitação.....	28
2.5	Avaliação Funcional da Célula Espermática.....	31
2.5.1	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões.....	31
2.6	Inseminação Artificial na Raça Brava.....	33
2.6.1	Vantagens da Inseminação Artificial na Raça Brava.....	34
2.6.2	Desvantagens da Inseminação Artificial na Raça Brava.....	34
2.6.3	Preparação para a Inseminação Artificial em Vacas Bravas...	35
III.	Materiais e Métodos.....	36

3.1	Recolha dos Testículos e Transporte.....	36
3.2	Recolha do Sémen do Epidídimo.....	37
3.3	Preparação das Palhinhas de Sémen.....	38
3.4	Congelação das Palhinhas de sémen.....	40
3.5	Descongelção das palhinhas de sémen.....	40
3.6	Avaliação da Motilidade Espermática.....	41
3.7	Citometria de Fluxo.....	42
3.7.1	Avaliação da Integridade da Membrana e Viabilidade Espermática.....	42
3.7.2	Integridade Acrossómica.....	43
3.8	Métodos de Indução \ Detecção de Cio Utilizados.....	44
3.9	Procedimentos de Inseminação e Diagnóstico de Gestação.....	46
3.10	Análise Estatística.....	46
IV.	Resultados.....	47
4.1	Resultados dos Testes Laboratoriais.....	47
4.1.1	Teste da Motilidade Espermática.....	47
4.1.2	Teste de Viabilidade.....	48
4.1.3	Teste de Integridade Acrossómica.....	49
4.1.3.1	Membrana Plasmática e Acrossoma Intatos.....	49
4.1.3.2	Membrana Plasmática Intata e Acrossoma Danificado.....	50
4.2	Resultados da Inseminação Artificial.....	52
V.	Discussão.....	53
VI.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	59
VII.	Bibliografia.....	61

I. Introdução

A origem do touro bravo provém das distintas raças bovinas autóctones que existiam na Península Ibérica e que se alimentavam da vegetação espontânea em completa liberdade. Deste gado foram sucessivamente escolhidos os mais ásperos para a celebração dos distintos espetáculos taurinos. A diversidade na origem desta raça vai provocar, que com o passar dos anos, se constituam diferentes manadas de gado que divergem quanto ao tipo de animais que possuem (Domecq, 2009). Nos séculos XV e XVI há relatos históricos da escolha nas manadas selvagens dos animais mais indomáveis pelos talhantes, que depois eram alugados às populações e posteriormente abatidos (Garrido, 2012). Existia o costume de vender a carne do touro lidado às populações, sendo que uma parte dos lucros era oferecida a obras de caridade ou à igreja (Viard, 2010)

As ganadarias começam a dar os seus primeiros passos já século XVII passando a ser uma diversão dos grandes latifundiários de então (Garrido, 2012). A multiplicação de festas taurinas e o bom preço a que eram pagos os touros mais agressivos estimulam os grandes proprietários, que além de adquirirem títulos nobiliários, lançam-se na produção de touros bravos. Os bovinos que se reproduziam aleatoriamente começaram a ser selecionados pela sua agressividade, pelo que a reprodução destas vacadas passou a ser mais orientada (Viard, 2010). A seleção de touros bravos na Península Ibérica para os festejos taurinos tem o seu início no final do século XVIII em Espanha (Domecq, 2009), se bem que em Portugal só no final do século XIX e princípios do século XX é iniciada a seleção da raça, após a introdução dos primeiros reprodutores espanhóis em 1883 (Lucas, 2012).

O primeiro semental de lide chega à Ilha Terceira em 1910, mas é a partir da década de 50 que o conceito de bravura moderna começa a ser introduzido. A ganadaria

de Castro Parreira, fundada na década de 40, foi pioneira na seleção dos animais bravos tendo por base os mesmos critérios que se usavam no continente português (Lima *et al.*, 2014). Na Ilha Terceira, o touro bravo é um animal resultante da introdução, nesta ilha, de animais da raça brava oriunda da Península Ibérica (Bruges, 1997). Estes, ao longo dos anos, sofreram uma adaptação às condições edafoclimáticas da região, dando origem a um animal morfologicamente e do ponto de vista comportamental diferente dos seus predecessores. Essa subpopulação (ecótipo) com características muito próprias é ideal para as touradas à corda, fenómeno cultural muito típico desta Ilha (Dias, 2002). No entanto a importação de animais da mesma raça com maior aptidão para a lide em arena (a partir de 1910), tornou a Ilha Terceira num dos principais centros de produção deste tipo de gado bovino em Portugal (**Figura 1**).

A exploração destes animais assume, para a região, um papel fundamental em termos ambientais, culturais, históricos e socioeconómicos (Dentinho, 1998). Devido a essa importância conjugada com o facto de se tratar de um animal característico à região, o número reduzido de elementos torna imperativo a salvaguarda desse património genético (Correia, 2012).

As dificuldades de importação de reprodutores provenientes da Península Ibérica e a alta incidência da paratuberculose bovina são as principais dificuldades na exploração do touro bravo nos Açores (Botelho, 2000).

Observamos que muitas vezes o potencial genético de certos reprodutores perde-se abruptamente, pois o seu característico comportamento, patologias e as sucessivas solicitações que estes animais são alvo levam, muitas vezes, a perdas não esperadas nos efetivos ganaderos.

A criação de bancos de sémen em cada ganadaria e o acompanhamento técnico da reprodução destes animais pode ser uma importante estratégia a utilizar nesta

atividade pecuária, daí que se pretenda que este trabalho contribua para incrementar o que já se faz de positivo na reprodução do toiro bravo.

O método tradicional de exploração da raça bovina brava é um sistema extensivo puro, que conserva a maior parte das tradições dos séculos anteriores. O manejo destes animais é muito complicado devido à especial idiossincrasia dos exemplares da raça, caracterizados pela sua agressividade inata que tornam qualquer manipulação do homem uma tarefa bastante especializada e difícil (Buxadé, 1996).

O sistema habitual de reprodução do gado de lide é a monta natural em completa liberdade. No entanto a inseminação artificial tem cada vez mais importância,



Figura 1: Aspeto de uma tourada à corda na Ilha Terceira.

promovendo-se a extração e criopreservação de sêmen de animais com altas performances. Esta preservação de património genético é uma ferramenta importante que se oferece aos ganadeiros e que é cada vez mais utilizada pelos mesmos (Montesinos, 1992).

Sabemos atualmente que esta raça assume um papel crescente de importância nos meios científicos, já com alguns incrementos de nova informação que facilitam o manejo desta raça bovina singular.

O objetivo deste trabalho centra-se no aproveitamento do potencial dos machos de raça brava existentes na Ilha Terceira, com criopreservação dos seus gâmetas e utilização em Inseminação Artificial (IA).

II. Revisão Bibliográfica

2 Reprodução da Raça Brava

2.1 Reprodução do Touro Bravo

2.1.1 Anatomia do Sistema Reprodutor do Touro

Os órgãos reprodutivos dos bovinos machos compreendem (**Figura 2**):

- Testículos
- Epidídimo
- Conduitos deferentes
- Glândulas acessórias
- Órgãos de evacuação de sémen

2.1.1.1 Testículos:

São órgãos sexuais primários que têm como funções principais a produção de espermatozoides (função exócrina) e de hormonas esteróides (função endócrina) (Galina *et al.*, 2006).

Nos bovinos os testículos estão colocados na região inguinal. Apresentam uma forma oval alargada com dimensões entre os 10 a 15 cm de comprimento e 5 a 8.5 de diâmetro com um eixo longitudinal (Pezzone, 2013). Apresentam posicionamento vertical (Galina *et al.*, 2006).

Nos animais mamíferos, o escroto situa-se entre as coxas e encerra os testículos. A inserção pendente do escroto serve para manter os testículos a uma temperatura inferior à corporal. Esta camada de pele é uma capa de pele grossa que envolve os testículos e toma parte do mecanismo termorregulador que permite a temperatura ótima para a espermatogénese (Hafez *et al.*, 2000)

A superfície testicular está recoberta por uma fina lâmina: a túnica vaginal própria, esta estende-se à volta de uma cápsula fibrosa chamada a túnica albugínea, que envolve todo o parênquima testicular e é responsável pela forma oval do mesmo (Pezzone, 2013). Desde a cápsula irradiam em direção ao interior do testículo pequenos tabiques de tecido conjuntivo que dividem o parênquima testicular em lóbulos. Estes tabiques unem-se entre si no eixo testicular para formar o mediastino do testículo (Konig *et al.*, 2002). O parênquima testicular está composto principalmente pelos túbulos seminíferos (90 % do órgão) (Pezzone, 2013).

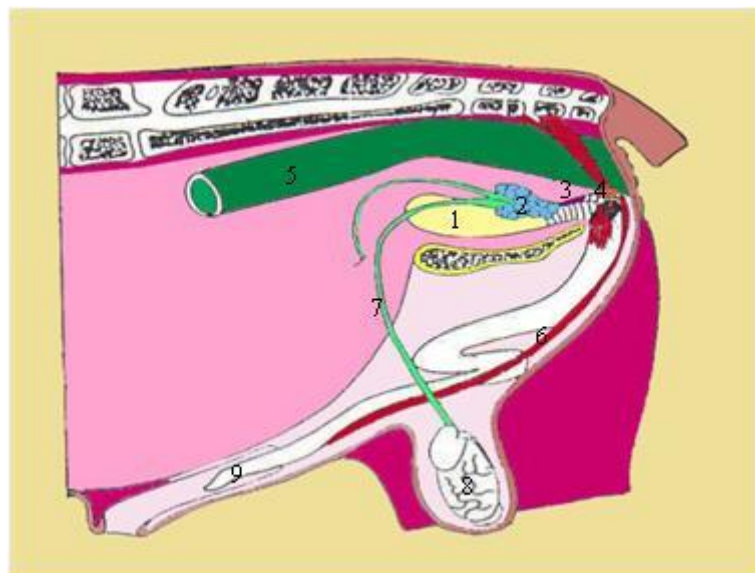


Figura 2: Anatomia do Sistema Reprodutor do Touro. 1- Bexiga; 2-Glândulas vesiculares; 3- Próstata; 4- Glândula Bulbouretral; 5- Reto; 6- Músculo Retrator do Pênis; 7- Conduto Deferente; 8- Testículo; 9-Epidídimo; 10- Glande do Pênis (Pezzone, 2013).

Cada lóbulo testicular contém entre dois e cinco canalículos testiculares contorneados e a sua função é a formação de células germinais masculinas. (Konig *et al.*, 2002). A parede destes canalículos contém as células de Sertoli, necessárias para a nutrição das células germinais em formação (Pezzone, 2013), e células do epitélio germinativo que se convertem depois em espermatozoides (Konig *et al.*, 2002).

2.1.1.2 Epidídimo

Consiste num único, longo e compacto tubo enrolado, com um suporte de elementos de tecido conjuntivo que o fixa ao testículo. Apresenta um diâmetro que varia entre os 70 e 500 mm (Pezzone, 2013).

Convencionalmente está dividido em três regiões:

-cabeça: Unida firmemente ao testículo e está situada em posição caudo-dorsal em relação ao contorno longitudinal médio do testículo (Dyce *et al*, 2007). Está formada por 13 a 15 condutos eferentes.

-corpo: estende-se pela face medial e caudal do testículo e está menos fixado ao testículo;

-cauda: situada no polo distal do mesmo, armazenando uma quantidade significativa de espermatozoide (Pezzone, 2013). Está fixa ao testículo pelo ligamento próprio, e à medida que reduz o seu volume origina o duto deferente (Dyce *et al*, 2007).

2.1.1.3 Dutos Eferentes e Canal Epididimário:

Os dutos eferentes e o canal epididimário estão rodeados por fibras musculares lisas circulares que aumentam o seu diâmetro ao nível da cauda do epidídimo e compreendem também fibras longitudinais do mesmo tipo. Esta musculatura é responsável pelas contrações peristálticas regulares cada 2 a 10 segundos que asseguram o movimento dos espermatozoides no epidídimo (Pezzone, 2013).

A inervação é abundante ao nível da cauda do epidídimo; a de tipo noradrenérgica provém dos neurónios ganglionares que recebem aferências dos nervos hipogástricos e pélvicos, existindo também uma inervação de tipo colinérgica. Em geral, todos estes ramos nervosos participam no relaxamento (que permite o armazenamento

de espermatozoides na cauda do epidídimo) e na contração que promove a expulsão de uma fração espermática durante a ejaculação (Knobil *et al.*, 2003).

A vascularização dá-se por intermédio de três troncos arteriovenosos. Dois deles pertencem ao sistema “ Arterio - Espermático – Plexo Pampiniforme” que irrigam a cabeça e a cauda do epidídimo. O terceiro provém do sistema ilíaco e irriga a cauda e canal deferente (Pezzone, 2013).

As funções epididimárias, são o transporte, a sobrevivência e maturação funcional dos espermatozoides. A maturação por sua vez inclui:

- capacidade de motilidade progressiva;
- condensação final do núcleo e modificações na forma do acrossoma;
- alterações na natureza da membrana plasmática;
- migração da gota citoplasmática proximal para a porção distal da peça intermédia;
- diminuição da concentração de oxigénio para inibir o metabolismo dos espermatozoides;
- reabsorção, fagocitose dos espermatozoides deficientes;
- armazenamento dos espermatozoides.

Os espermatozoides são produzidos de forma regular e expulsados continuamente pelos tubos seminíferos, mas são imóveis no líquido testicular. Os cílios do epitélio dos canais eferentes contribuem para a progressão dos espermatozoides para a cabeça do epidídimo. No epidídimo as contrações rítmicas asseguram o seu movimento (Pezzone, 2013).

2.1.1.4 Glândulas Acessórias

As principais glândulas anexas do aparelho reprodutor do bovino macho são:

- glândulas vesiculares, também chamadas de vesículas seminais

- glândulas bulbouretrais ou de Cowper
- próstata

2.1.1.4.1 Vesículas Seminais

Consiste num par de glândulas genitais situadas na base ventral da pélvis de cada lado da bexiga (Pezzone, 2013). O conduto das vesículas seminais e o conduto deferente partilham o conduto ejaculatório que termina na uretra (Hafez *et al*, 2000).

Estas glândulas segregam um líquido claro que tem como função aumentar o volume do ejaculado e servir como tampão ao sémen. Cerca de 50 % do volume total de sémen é produzido por estas estruturas (Pezzone, 2013).

2.1.1.4.2 Glândulas Bulbouretrais

Encontram-se a cada lado da uretra pélvica, perto do arco isquiático (Pezzone, 2013). No touro são quase ocultas pelo músculo bulboesponjoso (Olivera, 2009).

A secreção destas glândulas não formam parte do ejaculado, já que as suas funções são basicamente desobstruir e lubrificar a uretra para a passagem do ejaculado (Galina *et al*, 2006)

2.1.1.4.3 Próstata

Encontram-se em posição caudal às vesículas seminais e dorsalmente à uretra (Olivera, 2009). As suas secreções misturam-se com o sémen por numerosos condutos que comunicam com a uretra pélvica. Pode ser avaliada por palpação rectal (Pezzone, 2013).

2.1.1.5 Órgãos de Evacuação de Sémen

- Conduto deferente
- Uretra
- Pénis

2.1.1.5.1 Conduto Deferente

Faz a comunicação entre a cauda do epidídimo e a uretra pélvica. Ascende ao abdómen pelo canal inguinal; ao nível da face dorsal da bexiga urinária dilata-se formando a ampola do conduto deferente. A sua função é contribuir na emissão de sémen durante a ejaculação, transportando espermatozoides mediante as ondas de peristaltismo desde a cauda do epidídimo (Pezzone, 2013).

2.1.1.5.2 Uretra

Divide-se em duas porções uretra pélvica e peniana. A primeira recebe todas as secreções das glândulas anexas e os espermatozoides desde o conduto deferente (Pezzone, 2013). Começa no orifício uretral interno, no extremo caudal da bexiga e chega até ao orifício uretral externo no limite distal do pénis (Olivera, 2009).

Revestida por músculo-esquelético que mantém a onda de contração ejaculatória. Alberga o colículo seminal da uretra craneo-dorsal e recebe as secreções das glândulas vesiculares e o esperma proveniente das âmpolas (Konig *et al.*, 2002)

Durante a ejaculação, o esfíncter vesical encerra toda a comunicação com a bexiga urinária, de tal modo que o sémen não circule para dentro da mesma e para que a urina, que têm propriedades espermicidas, não penetre na uretra durante a ejaculação (Pezzone, 2013).

2.1.1.5.3 Pénis

É o órgão copulador do macho (Pezzone, 2013). A raiz localiza-se no músculo bulboesponjoso. O touro tem um pénis fibro-elástico. À medida que segue em direção ventral, este forma uma curva em “S”, chamada flexura sigmoide. A função deste segmento é retrain o pénis e mantê-lo protegido. Durante a ereção, a flexura sigmoide torna-se reta e o pénis estende-se para os fins de cópula (Galina *et al.*, 2006)

2.1.2 Fertilidade do Touro

No macho a puberdade é um processo gradual com incremento progressivo na produção de espermatozoides e capacidade de monta (González *et al.*, 1995). O bovino de lide macho alcança a sua capacidade fecundante aos 10-12 meses de idade, daí a importância de separar os machos das fêmeas praticamente após o desmame por volta dos 8 meses (Garrido, 2008) (**Figura 3**).



Figura 3: Novilhos bravos com 1 ano de idade já separados do grupo de fêmeas com a mesma idade.

A puberdade define-se como a altura de vida a partir do qual um bovino macho é capaz de provocar uma gestação. Para que se consiga este fenómeno é necessário, pelo menos 50

milhões de espermatozoides por cada ejaculação, dos quais 10% devem demonstrar motilidade precoce.

O Volume de sémen produzido por ejaculação varia de 2 a 5 ml em touros jovens e de 5 a 15 ml em touros de maior idade (González *et al.*, 1995).

Ao contrário da fêmea o macho de lide apresenta libido permanente praticamente durante todo o ano, aumentando consideravelmente quando chega a primavera e os dias com maior tempo de luz e diminuindo com os meses de inverno (Lima *et al.*, 2014)

A idade dos machos que melhores resultados tem na reprodução das ganadarias bravas situa-se entre os 5 e os 12 anos, havendo mesmo casos de sementais que beneficiaram vacas com bons resultados com 15 anos de idade (Garrido, 2008).

O processo de seleção de touros reprodutores é muito importante e estes devem possuir um elevado potencial genético e corretas características reprodutivas. Devem ter os órgãos sexuais bem desenvolvidos, produzir sémen de excelente qualidade, mostrar libido e ter capacidade para montar e beneficiar efetivamente as fêmeas (Peinado, 2006)

2.1.3 Controlo Fisiológico da Reprodução no Macho

As hormonas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção das características masculinas são as gonadotrofinas: a hormona luteinizante (LH) e a hormona foliculoestimulante (FSH) produzida pela glândula pituitária; as hormonas esteroides androgénicas, incluindo a testosterona, produzida pelos testículos e a inibina. As hormonas esteroides femininas, estradiol e estrona, também desempenham um papel importante em certas circunstâncias.

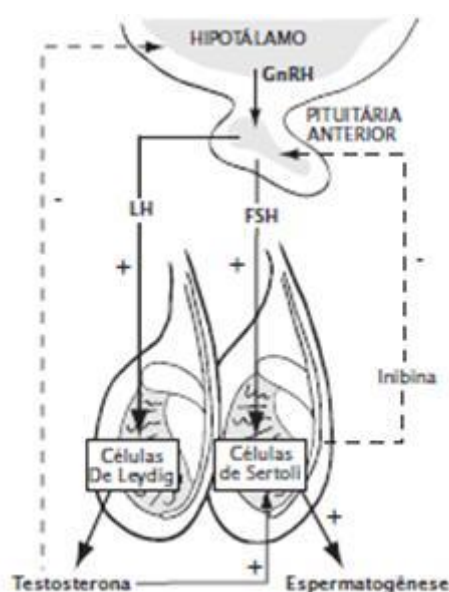


Figura 4: Controle Fisiológico da Reprodução no macho (Mihm *et al.*, 2003).

Leydig (Norman *et al.*, 1997)

A testosterona (atua nas células de Sertoli) também é necessária para a espermatogénese. Juntamente com outros androgénios, é responsável pela diferenciação e maturação dos órgãos reprodutivos masculinos, pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e pelo comportamento de macho (Cormier *et al.*, 1997). A testosterona exerce efeito negativo na secreção de LH suprimindo a libertação pulsátil de GnRH a partir do hipotálamo. (Parker *et al.*, 2013) (**Figura 4**).

2.2 Reprodução na Vaca Brava

2.2.1 Anatomia do Sistema Reprodutor da Fêmea Bovina Brava

À exceção da vulva, todos os componentes do sistema reprodutivo da vaca, estão localizados no interior do corpo do animal. Estas são palpáveis via retal (Prange *et al.*, 1998) (Figura 5).

Os componentes do sistema reprodutivo da vaca são:

A Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH), produzida pelo Sistema Nervoso Central, estimula a libertação de FSH e LH. A FSH age diretamente nos túbulos seminíferos dos testículos (células germinativas e células de Sertoli), estimulando a espermatogénese. As células de Sertoli produzem inibina, que tem um efeito *feedback* negativo na produção de FSH pela glândula pituitária. A LH estimula a libertação de testosterona pelas células de

- Vulva
- Vagina
- Cérvix
- Utero
- Oviduto
- Ovários

2.2.1.1 Vulva

É a abertura externa do aparelho reprodutor da vaca. A vulva tem três funções: deixar passar a urina, abrir-se para permitir a cópula e é parte do canal do parto. Incluídos nesta estrutura estão os lábios e o clitóris (Dejarnette *et al.*, 2006). As dobras engrossadas da pele desta estrutura são sensíveis às variações de estrogénio. Quando estas aparecem ruborizadas e tumefactas podem ser úteis na deteção do cio (Prange *et al.*, 1998).

2.2.1.2 Vagina

A vagina estende-se desde a abertura uretral até ao cérvix (Dejarnette *et al.*, 2006) e serve de receptáculo para o pénis do touro durante a cópula. O sémen é colocado durante a monta natural na vagina perto do cérvix (Parker *et al.*, 2013).

Esta estrutura é uma importante defesa contra a infeção bacteriana, já que o seu epitélio secreta fluidos que combinados com os cervicais inibem o crescimento bacteriano (Prange *et al.*, 1998).

A proteção de infeções pode não ser suficiente se não são salvaguardadas as boas práticas sanitárias no momento da IA, causando vaginites e infeções do útero. Algumas das principais patologias reprodutivas bacterianas e víricas da vaca de leite causam grandes perdas económicas e sanitárias e veiculadas pelo semental ou cateter de IA (Caballero, 2001).

2.2.1.3 Cérvix

É um órgão de paredes grossas que estabelece a comunicação entre a vagina e o útero (Dejarnette *et al.*, 2006). As paredes deste órgão são mais espessas que as da vagina e apresentam 3 ou 4 pregas chamadas de anéis cervicais distinguidas por palpação retal (Parker *et al.*, 2013).

Esta estrutura restringe o acesso ao útero. É uma barreira física que protege o útero de corpos estranhos e bacterianos durante a gravidez. As secreções do epitélio que reveste o cérvix facilitam a transferência de sémen para o útero (Prange *et al.*, 1998).

Na raça brava de lide esta estrutura apresenta uma maior longitude. Esta característica advém da maior rusticidade da raça, adaptada a comportamentos de fuga de predadores e a deslocação de longas distâncias em busca de alimento (González *et al.*, 1995).

2.2.1.4 Útero

Na raça brava o útero é constituído apenas pelo pelos cornos uterinos sem apresentar um corpo uterino (Peinado, 2006) (**Figura 5**)

O útero tem várias funções. As suas paredes são compostas por várias camadas de músculo que ajudam no transporte de sémen para o oviduto e na expulsão do vitelo ao nascimento (Prange *et al.*, 1998). Os dois cornos uterinos são formados por três camadas musculares e uma intrincada rede de vasos sanguíneos. Quando a vaca é beneficiada por monta natural ou IA, os músculos uterinos, sob influência dos estrogénios e oxitocina, contrai-se ritmicamente para fomentar o transporte dos espermatozoides para o oviduto (Dejarnette *et al.*, 2006).

O útero é responsável pela formação do lado materno da placenta, nomeadamente a formação de carúnculas que ligados aos cotilédones da parte fetal da placenta garantem a sobrevivência do feto durante a gestação (Prange *et al.*,1998).



Figura 5: Comparação entre útero de primípara de raça brava (esquerda) e útero de primípara da raça limousine (direita).

2.2.1.5 Ovidutos

Estas estruturas conduzem os óvulos para o útero (Dejarnette *et al.*, 2006). O limite ovárico do oviduto termina em forma de funil e é chamado o infundíbulo (Prange *et al.*,1998). Na vaca de lide este infundíbulo apresenta um tamanho maior quando comparado com outras raças leiteiras e de carne rodeando grande parte do ovário (Peinado, 2006).

O infundíbulo rodeia os ovários e recebe o óvulo libertado do ovário durante a ovulação, evitando que estes caiam na cavidade abdominal. Daí o óvulo segue até ao limite distal alargado do oviduto designado ampola (Prange *et al.*,1998).

2.2.1.6 Ovários

Os ovários estão suspensos pelo ligamento largo junto ao término do oviduto acompanhando a forma arredondada dos cornos uterinos (Prange *et al.*,1998).

Na vaca de lide os ovários são pequenos quando comparados com outras raças e as suas estruturas foliculares não são tão palpáveis (García I., 1991)

Os ovários contêm milhares de folículos produzidos ainda no embrião antes do nascimento (Prange *et al.*, 1998).

São os órgãos principais do aparelho reprodutor feminino. Têm duas funções: a produção de óvulos e a segregação de hormonas principalmente o estrogénio e progesterona durante as principais fases do ciclo éstrico (Dejarnette *et al.*, 2006).

2.2.2 Fertilidade na Fêmea Bovina Brava

O cio é um conjunto de sinais fisiológicos e comportamentais que se produzem na vaca de lide durante 6 a 10 horas e a ovulação ocorre 8 a 12 horas depois do início do cio (Garrido, 2008). Se a vaca não ficar gestante este cio repete-se ao fim de 17-20 dias (Peinado, 2006).

Os sinais são evidentes: a vaca fica arisca e inquieta, mostra-se muito nervosa; perde apetite, a vulva fica tumefata e com constantes micções (González, 1995).

A vaca de lide atinge a puberdade aos 9-13 meses adquirindo maturidade sexual aos 15 meses.

Geralmente a raça apresenta um anestro estacional. Em climas temperados, a tendência de partos produz-se no Outono e Primavera isto apesar de não implicar uma estacionalidade obrigatória (Peinado, 2006). A vaca pare em alturas com abundância de pastagens constituindo um mecanismo primitivo de perpetuação da raça (Lima *et al.*, 2014). Há um efeito marcado do fotoperíodo, temperatura e pluviometria na estacionalidade reprodutiva (Peinado, 2006).

No meio do Oceano Atlântico a reprodução do toiro depende de influências ambientais. A época de partos ocorre quando há disponibilidade alimentar. É normal

que no interior da ilha as pastagens sejam mais ricas e abundantes a partir de finais de maio até princípios de julho. O instinto animal programa o nascimento dos vitelos nas alturas em que a mãe se pode alimentar melhor e fornecer leite em quantidade e com qualidade ao jovem recém-nascido.

Com um tempo de gestação de nove meses a cópula dá-se em setembro e outubro altura em que a pastagem ainda tem forragem suficiente para desencadear comportamentos de cio nas fêmeas.

A reprodução de qualquer espécie tem sempre a influência de muitos fatores externos. A alimentação, a temperatura e as horas de luz são fundamentais para o desencadear destes fenómenos.

A cobrição e parto das vacas mães de animais para a corda, tem ainda uma vincada influência do ambiente. São animais mais adaptados, mais rústicos e com muito menos cuidados humanos. O seu comportamento reprodutivo segue sobretudo o indicado anteriormente.

O gado de lide importado para a Ilha Terceira não apresenta, como é natural, o mesmo grau de adaptação que está presente no gado rústico mais direcionado para a tourada à corda. São animais de outras zonas geográficas mais secas e com as estações do ano mais marcadas.

O toiro de lide pela sua exigência necessita de um maneio alimentar mais cuidado. Tanto toiros como vacas são alimentados com recurso a pastagens ao qual se juntam os suplementos em forma de concentrado ou silagem. Como consequência vemos que a sua época de reprodução é mais alongada no ano com partos desde outubro até finais de março. Como não se sente tanto a escassez ou abundância de alimento disponível o seu comportamento de reprodução é mais modelado (Lima *et al.*, 2014).

2.2.3 Controle Fisiológico da Reprodução na Fêmea Bovina

Os princípios do mecanismo hormonal da reprodução são basicamente iguais em todas as espécies de animais domésticos. Os bovinos são poli-éstricos, sendo que a raça de lide por vezes poderá apresentar comportamento de poli-éstrica estacional (Mas, *et al.*, 2011).

Os bovinos ovulam espontaneamente controlados por mecanismos fisiológicos (González *et al.*, 1995). O processo reprodutivo é regulado por uma cascata de atividades combinadas, do sistema nervoso central, tecidos secretórios, tecidos alvo e várias hormonas (**Figura 6**).

O sistema nervoso central recebe informações do ambiente onde o animal se encontra (estímulo visual, olfativo, auditivo e tátil) e envia a informação relevante do ponto de vista reprodutivo para as gónadas via eixo hipotálamo-pituitária. Não são apenas produtores de hormonas mas também órgãos alvo, formando um sofisticado sistema homeostático de *feedback*, por meio do qual regulam a sua própria taxa de secreção (Norman *et al.*, 1997). A partir de um estímulo do sistema nervoso central, os neurónios no hipotálamos produzem GNRH. A GNRH é transportada pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário ao lobo anterior da pituitária, seu órgão alvo, estimulando as células da pituitária a segregar FSH e a LH. A GNRH, FSH e LH não são segregadas em níveis constantes, mas em uma série de pulsos. A FSH estimula o desenvolvimento dos folículos ovários. Na teca interna do folículo, a LH estimula a síntese de androstenediona a partir do colesterol.

A androstenediona é convertida em testosterona, que é aromatizada em estradiol-17 β sob a influência da FSH, nas células da granulosa do folículo. O estradiol exerce um *feedback* positivo no hipotálamo e na pituitária, aumentando a frequência dos pulsos de GNRH. Quando o estradiol ultrapassa um certo nível, o hipotálamo responde com

um pico de GNRH que, por sua vez, induz um pico de LH que inicia a ovulação. Assim, o FSH estimula o crescimento dos folículos ovários, enquanto a LH estimula a sua maturação, produção de estradiol e ovulação (González *et al.*, 1995). A LH dá suporte à formação e à função inicial do corpo lúteo.

Um dos principais efeitos do estradiol é a indução dos sintomas de cio. O estro pode ser descrito como os sinais comportamentais e físicos que indicam aos outros animais que a fêmea está na fase fértil de seu ciclo, e vai permitir a cobertura pelo macho (Norman *et al.*, 1997).

As células da granulosa também produzem inibina. Nem todos os efeitos desta hormona são compreendidos, mas seu nome é derivado do *feedback* negativo que provoca a liberação de FSH da glândula pituitária, controlando assim o envolvimento dos folículos. Depois da ovulação, os restos do folículo são remodelados, formando o corpo lúteo, sob a influência da LH (Mihm *et al.*, 2003).

A cavidade folicular é preenchida com vasos sanguíneos, e as células da granulosa aumentam de tamanho. O corpo lúteo é um órgão que produz basicamente progesterona e oxitocina.

A progesterona é essencial para o ciclo normal na vaca e, após a concepção, é a principal hormona responsável pela manutenção da gestação. Ela provoca redução da liberação dos pulsos de GNRH, e assim inibe novas ovulações. Além disso, prepara o endométrio para a nidação (na realidade, implantação) do embrião em desenvolvimento, e inibe as contrações da parede uterina que podem ser danosas para a gestação. Se o oócito libertado pelo folículo durante a ovulação não é fertilizado, não são recebidos sinais de prenhez vindos do embrião. Por volta do dia 16 pós ovulação, o endométrio do útero não gestante irá liberar prostaglandina F2 α (PGF2 α) (González *et al.*, 1995).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ dá início à regressão do corpo lúteo, denominada luteólise. O mecanismo luteolítico da prostaglandina ainda não foi completamente elucidado, mas envolve redução do suprimento sanguíneo para o corpo lúteo via vasoconstrição, bem como um efeito direto nas células luteínicas propriamente ditas. A oxitocina produzida no corpo lúteo também desempenha um papel importante na luteólise (Ginther *et al.*, 2003).

Como resultado da regressão do corpo lúteo, as concentrações de progesterona diminuem, removendo o bloqueio sobre a liberação de GnRH pelo hipotálamo. Isto provoca início de uma nova fase folicular, com desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório. A fase que envolve crescimento folicular, cio e ovulação é denominado fase folicular do ciclo. A fase dominada pela progesterona, a partir da ovulação até a luteólise, é chamada fase luteínica (Peinado, 2006).

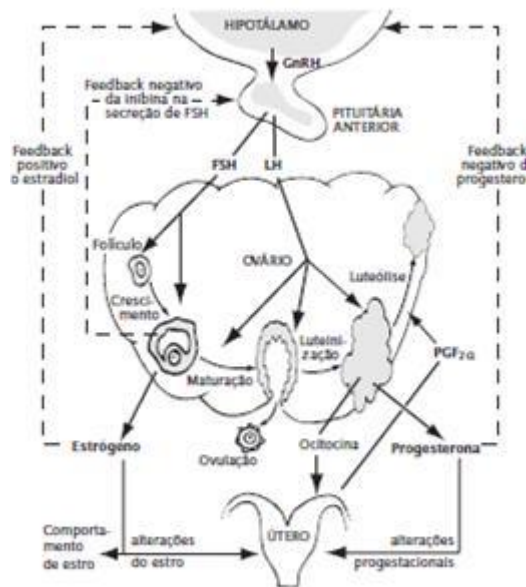


Figura 6: Controle Fisiológico da Reprodução na Vaca (Mihm *et al.*, 2003).

2.3 Criopreservação de Sémen Bovino Recolhido do Epidídimo

A criopresevação de sémen busca promover a conservação do germoplasma por tempo indeterminado e pode permitir a preservação de material genético de animais que morreram inesperadamente, quando os espermatozoides são recolhidos do epidídimo (Martins *et al.*, 2006). Esta opção é viável para preservar gâmetas masculinos e desta forma manter um banco de germoplasma (Tittarelli *et al.*, 2006).

Em Espanha com a morte do touro na arena a recolha de sémen post-mortem através do epidídimo tem sido uma técnica recorrentemente utilizado, perpetuando as caraterísticas positivas evidenciadas pelo animal antes da sua morte (Garrido, 2008).

Em casos particulares o sémen epididimal é a única fonte de gâmetas masculinos, para uso em programas de reprodução. Por exemplo a recolha urgente de animais lesionados pode significar o aproveitamento das capacidades genéticas do animal (Goovaerts *et al.*, 2006).

A congelação de sémen de espermatozoides bovinos para uso na inseminação artificial é uma tecnologia que tem tido grandes progressos no campo da reprodução e melhoramento genético populacional (Ayala, 2007).

São várias as descrições em literatura científica do nascimento de vitelos originados de espermatozoides frescos ou congelados, recoletados da cauda do epidídimo de touros com resultados zootécnicos perfeitamente aceitáveis (Barrios, 2002).

2.3.1 Uso dos Espermatozoides do Epidídimo

A função de armazenamento do epidídimo é demonstrada pelo fato dos espermatozoides ejaculados sobreviverem 24 horas em meio diluidor. Os que são mantidos na cauda do epidídimo *in vivo* permanecem com boa viabilidade por mais de

15 dias (Muradás *et al.*, 2006). Esta viabilidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides. Durante o armazenamento, o epidídimo acumula espermatozoides que podem ou não ser utilizados na cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho. Em touros o número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas, dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (Bedford, 1994).

Os espermatozoides do epidídimo têm a capacidade de fertilizar oócitos, contudo as taxas de concepção são mais baixas quando se realiza a fecundação *in vitro*. A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmatic sperm injection-ICSI*) foi usada em humanos como técnica de reprodução assistida para superar problemas relacionados com a baixa qualidade do espermatozoide. Combinando a ICSI com os espermatozoides colhidos do epidídimo conseguiu-se taxas de fertilização e concepção semelhantes às conseguidas com os espermatozoides do ejaculado (Schlegel, 1999).

Os espermatozoides recolhidos do epidídimo mostram uma maior resistência ao choque exercido pelo frio que as células espermáticas do ejaculado, sugerindo que estas podem ser utilizadas mais convenientemente para a criopreservação (Kikuchi *et al.*, 1998).

A colheita de sémen da cauda do epidídimo mostrou-se eficiente para recuperar células espermáticas (Walters *et al.*, 2006) e estes espermatozoides apresentam mobilidade progressiva igual ou superior aos colhidos em vagina artificial (Tiplady, 2002).

Nas amostras recolhidas do epidídimo o defeito na cauda dos espermatozoides é o principal defeito encontrado, seguindo-se os defeitos na peça intermédia. Estas

alterações são muitas vezes atribuídas a imaturidade do material recuperado do epidídimo. Apesar destas anormalidades a capacidade fecundante dos espermatozoides pós-criopreservação resultam em gestações e nascimento de vitelos saudáveis (Ferrão, *et al.*, 2010).

2.3.2 Criopreservação a partir do Epidídimo

Quando se pretende congelar e descongelar gâmetas do macho, é importante considerar as diferenças que existem entre os espermatozoides do ejaculado e os extraídos do epidídimo, tanto morfológico como funcional. Essas diferenças no momento de congelação podem influenciar a estabilidade da membrana frente ao choque térmico e pressão osmótica (Ayala, 2007).

Atualmente podem encontrar-se múltiplas alternativas para preservar os espermatozoides : congelação dos gâmetas, dos tecidos (epidídimo), refrigeração de epidídimos obtidos após a morte e outras em que se pretendem simular as condições fisiológicas do epidídimo *in vitro*. Até agora tem sido difícil imitar as condições do epidídimo *in vitro*, no entanto alguns estudos demonstram capacidade de fertilizar depois de estarem armazenados vários dias em epidídimos refrigerados (De Pauw *et al.*, 2003).

Dentro dos fatores que determinam a viabilidade dos espermatozoides o tempo transcorrido desde a morte do animal até à congelação dos gâmetas e as manipulações que se dá ao epidídimo durante esse tempo vão influenciar a sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozoides (Anel *et al.*, 2002).

Os epidídimos de bovinos podem ser refrigerados até 72 horas sem perdas funcionais relevantes garantindo-se a viabilidade dos espermatozoides para criopreservação e utilização em técnicas de reprodução animal (Ferrão, *et al.*, 2010).

Para facilitar o procedimento de lavagem dos epidídimos, os mesmos deverão ser encaminhados juntamente com o cordão espermático, o qual deve ser ligado para evitar o extravasamento de sangue e de sémen do ducto deferente. Os conjuntos de testículos e epidídimos devem ser lavados externamente com solução de Ringer com lactato e acondicionados em recipientes de plástico.

Os epidídimos podem ser transportados em sistemas de refrigeração passiva para os centros de congelação de sémen (Bruemmer, 2006). Amostras oriundas de epidídimos refrigerados entre 4 °C a 5 °C durante 24 horas, tem apresentado boa congelabilidade em diferentes espécies (Sharma *et al.*, 2007). À temperatura ambiente, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo, tendo como limite de viabilidade próximo das 12 horas pós-orquiectomia. Este decréscimo pode não somente ser explicado devido ao envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozoides, mas também inerente ao processo de degradação tecidual pós-morte. Temperaturas mais baixas retardam o processo de degradação e diminuem o metabolismo dos espermatozoides, mantendo-os vivos por mais tempo (Granemann *et al.*, 2006).

2.4 Avaliação das Características Físicas e Morfológicas do Espermatozoide

Diversos métodos de análise laboratorial do sémen congelado bovino têm sido desenvolvidos, no entanto a correlação entre os parâmetros espermáticos e os índices de fertilidade *in vivo* ainda são variáveis. Dentre os principais testes de análise espermática utilizados, pode-se destacar: análise subjetiva da motilidade, análise computadorizada do movimento espermático e morfologia, testes de separação, análise morfofuncional por meio de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Embora nenhuma

técnica de avaliação efetuada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sémen bovino congelado.

A análise de rotina do sémen consiste na avaliação subjetiva da motilidade, estimativa da proporção de espermatozoides com morfologia normal e estimativa da concentração de espermatozoides por dose. Porém não se pode estimar a fertilidade do sémen baseado nestas avaliações (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997), uma vez que não é avaliada a capacidade do espermatozoide sofrer processos *in vivo*, tais como a capacitação e a reação acrossômica, necessárias para a fecundação (Ioneran *et al.*, 1994).

Nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sémen (Arruda *et al.*, 2003). Por essa razão têm ocorrido grandes avanços no estudo da célula espermática, permitindo o desenvolvimento de muitas técnicas para avaliar outros aspectos do espermatozoide, tais como: integridade da membrana plasmática e acrossomal, capacitação. A análise destes parâmetros fornece importantes informações sobre a amostra de sémen.

2.4.1 Avaliação da Motilidade Espermática

A motilidade espermática é uma avaliação importante, pois é essencial para a migração do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, bem como para a interação dos gametas na fecundação (Cox *et al.*, 2006; Suarez *et al.*, 2006).

O método mais utilizado para avaliação da cinética de movimento espermático é a determinação subjetiva da percentagem de células móveis numa amostra de sémen através de microscopia ótica. Este método é uma forma indireta de avaliação, sendo

simples e de baixo custo, no entanto, pode apresentar grande variabilidade (Garner *et al.*, 1997).

Na busca de uma maior objetividade na análise da motilidade, vários métodos têm sido propostos, tais como: passagem contínua, velocidade avaliada por laser, tempo de exposição à fotomicrografia, exposição múltipla de fotomicrografia, microcinematografia e sistema de análise computadorizado do movimento espermático (CASA), permitindo uma avaliação mais exata e objetiva da motilidade (Mortimer, 1997). Entre os métodos citados, o CASA tem sido o mais utilizado para avaliação objetiva, fornecendo informações precisas e significativas da cinética da célula espermática (Cox *et al.*, 2006). Este método baseia-se na obtenção de imagens precisas dos espermatozoides móveis. As imagens são obtidas através de uma leitura do campo avaliado com uma série consecutiva de flashes de 1 a 3 milisegundos, com uma frequência de aproximadamente 60 Hz. Após a aquisição, as imagens são imediatamente congeladas, e transmitidas sequencialmente para o processador de imagens, sendo digitalmente codificados. Cada imagem é então analisada separadamente pelo microprocessador, reconstruindo a trajetória espermática. Este tipo de avaliação determina não somente a percentagem de células móveis, mas também quantifica características específicas do movimento espermático (Garner *et al.*, 1997), tais como: velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos (BCF) e retilinearidade (LIN). No entanto, o sistema CASA também apresenta algumas desvantagens, como a identificação de artefactos celulares como célula espermática; a digitalização de espermatozoides aglutinados como sendo um único espermatozoide e junção de trajetória de dois espermatozoides após colisão (Mortimer, 1997).

Sendo a motilidade uma importante variável necessária para a fecundação, diversos estudos têm sido feitos na tentativa de correlacionar motilidade e fertilidade. Para análise visual (estimativa em percentagem), o nível de correlação pode variar entre 0,15 e 0,83 (Januskauskas *et al.*, 2003) e para estimativa pela análise computadorizada, entre 0,82 e 0,98 (Farrell *et al.*, 1998). De fato, alguns autores identificaram correlação entre motilidade espermática e fertilidade, tanto pela avaliação subjetiva quanto pela avaliação computadorizada (Januskauskas *et al.*, 2000; Gillan *et al.*, 2008).

Além da motilidade, o exame morfológico da célula espermática tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle de qualidade do sêmen. No entanto a avaliação individual da morfologia espermática, não permite predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen, sendo recomendada a avaliação conjunta de outras características espermáticas (Chacón *et al.*, 2001). O sistema de classificação para morfologia espermática foi inicialmente descrito por Langerlöf, em 1934. Mais tarde, Bloom (1950), subdividiu os defeitos morfológicos em primários e secundários. Este sistema foi novamente revisto por Rao (1971), que classificou os defeitos entre maiores e menores, de acordo com o prejuízo causado à fertilidade.

Saacke *et al.*, (1990) propuseram um novo modelo de classificação espermática, sendo defeitos compensatórios, que estão relacionados com incapacidade ou dificuldade de chegar ao local de fecundação e defeitos não compensatórios, que estão relacionados com a incapacidade de fecundação do ovócito.

Alguns estudos têm demonstrado que a fertilidade de uma amostra de sêmen cai progressivamente à medida que se aumentam as anormalidades morfológicas de espermatozoides presentes na amostra (Saacke *et al.*, 2000). Em geral, a fertilidade do touro diminui quando as células espermáticas anormais excedem 20% de defeitos totais e 10% de defeitos maiores, que incluem cabeça isolada, gota proximal, cauda enrolada,

cabeça piriforme, defeitos de acrossoma e defeitos de peça intermediária (Ax *et al.*, 2004).

Para identificação das patologias, diversas técnicas têm sido usadas, incluindo microscopia de campo claro e/ou contraste de fases, contraste interdiferencial (DIC), preparações utilizando corantes, como fucsina eosina, vermelho congo ou rosa bengala e microscopia eletrônica de transmissão (Barth *et al.*, 1989).

2.4.2 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática, Acrossomal e Capacitação

As características da célula espermática, como integridade das membranas plasmática e acrossomal, viabilidade e função celular podem ser avaliadas pela citometria de fluxo. Esta técnica possibilita a contagem, a classificação e o isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são individualmente movidas por meio de um sistema detector óptico em fluxo laminar e, então, contadas.

A descoberta de uma variedade de fluocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes tornou possível uma análise mais generalizada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultraestruturais e funcionais. A maior parte destes ensaios usando fluocromos têm sido desenvolvidos para a utilização na microscopia de epifluorescência. No entanto, a análise microscópica de um pequeno número de espermatozoides dentro de uma população pode ser subjetiva e, geralmente, não contempla toda a população espermática. A adaptação destas avaliações para uso em citometria de fluxo com marcadores fluorescentes representa uma forma rigorosa e rápida para avaliar atributos de uma amostra seminal (Gillan *et al.*, 2008).

A citometria de fluxo é hoje utilizada para avaliar diferentes características da célula espermática, tais como: estrutura da cromatina (Baker *et al.*, 2004), viabilidade espermática (Garner *et al.*, 1999; Gutierrez-Adán *et al.*, 2000), função mitocondrial (Graham *et al.*, 1990), *status* acrossomal e apoptose (Graham *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1997).

Com a utilização da citometria de fluxo, é possível ainda a avaliação de múltiplos parâmetros numa única amostra. A associação de sondas fluorescentes vai depender do tipo de laser, dos detectores de radiação e dos filtros presentes no citometro. Alguns citometros podem possuir até 16 detetores de radiação dispersa e fluorescente, o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares. Novas técnicas de associação de sondas fluorescentes são constantemente desenvolvidas para aplicação na citometria de fluxo visando a avaliação dos espermatozoides das mais diferentes espécies animais (Gillan *et al.*, 2008).

Os espermatozoides são constituídos por vários compartimentos na membrana plasmática, e a manutenção da integridade e funcionalidade desta membrana é de fundamental importância, visto que uma membrana intacta e funcionalmente ativa são requeridas para o metabolismo espermático, capacitação, reação do acrossoma, ligação e penetração do ovócito (Brito *et al.*, 2003). Sendo assim, a avaliação da funcionalidade das membranas parece ser um importante parâmetro para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides.

Mocé *et al.* (2006) definem integridade de membrana plasmática (IMP) como sinónimo de viabilidade espermática. Muitos estudos basearam-se na ideia de que a membrana plasmática intacta impede certos corantes de penetrarem na célula espermática. Estes estudos foram realizados inicialmente com avaliações de esfregaços secos de corante supravital, como eosina, conjugada ou não com nigrosina (Hancock,

1951) e posteriormente com azul de tripan (Wilson *et al.*, 1969), um corante carregado negativamente que não reage com a célula, a não ser que esta tenha uma lesão de membrana.

Outro método de avaliação da viabilidade da membrana plasmática baseia-se no princípio fisiológico do teste hipo-osmótico (HOS), desenvolvido por Jeyedran *et al.*, (1984). Segundo os autores, o HOS avalia a integridade funcional da MP e, estando intacta, quando o espermatozoide é incubado em solução hipo-osmótica ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência desse processo a membrana se expande causando o enrolamento da cauda; no entanto, se a membrana estiver danificada, essa reação não ocorre.

Tem sido desenvolvido e testado o uso de sondas fluorescentes para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou mesmo de potencial de membrana, o que tem provido novas ferramentas para avaliar a funcionalidade do espermatozoide pós-descongelção (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997). Os estudos iniciais para avaliação da IMP em espermatozoides com o uso de sondas fluorescentes citam o brometo de etídeo (Bilgili *et al.*, 1984; Halangk *et al.*, 1984), o qual penetra apenas em células com lesão de membrana, tendo especificidade por DNA, e quando intercalado à dupla hélice, sua fluorescência aumenta (Pal *et al.*, 1998), no entanto devido à sua grande toxicidade, o uso deste fluorocromo tem sido restringido. No entanto, outros corantes fluorescentes com propriedades similares passaram a ser utilizados, tais como o Hoechst 33342 e Hoechst 33258 (De Leeuw *et al.*, 1991; Casey *et al.*, 1993; Celeghini, 2005), Iodeto de Propídeo (PI) (Graham *et al.*, 1990; Garner *et al.*, 1999; Celeghini, 2005) e SYBR-14 (Graham *et al.*, 1990). Entre estes, o PI vem sendo mais amplamente utilizado devido à facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da IMP (Graham *et al.*, 1990). Dentro destes O PI é um fluorocromo de alta intensidade ao

qual a MP íntegra é impermeável. Dessa forma, ele se liga somente ao DNA de espermatozoides cuja membrana está danificada, corando o núcleo de vermelho (Garner *et al.*, 1999).

Atualmente, a associação de sondas fluorescentes vem sendo utilizada, tais como o uso simultâneo de PI e Hoechst 33342 (Casey *et al.*, 1993); PI e Hoechst 33258 (De Leeuw *et al.*, 1991); PI e SYBR-14 (Segovia *et al.*, 2000). Outra sonda que vem sendo amplamente utilizada juntamente com o PI para avaliação de IMP é o diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA). O C-FDA é um fluorocromo que penetra rapidamente na MP intacta, ainda na forma não fluorescente. No entanto, no interior da célula, o C-FDA é hidrolizado por esterases, resultando em 6-carboxifluoresceína livre, altamente fluorescente, o qual se torna impermeável à membrana íntegra, sendo retido no interior da célula com MP íntegra, fluorescendo de verde (Garner *et al.*, 1986). Devido ao grande número de possibilidades de avaliação de IMP por diferentes métodos, comparações entre diferentes tipos de colorações vêm sendo realizadas.

2.5 Avaliação Funcional da Célula Espermática

2.5.1 Produção *In Vitro* de Embriões

Embora a fertilização *in vitro* (FIV) representem as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais, o alto custo e consumo de tempo das avaliações, aliado a complexidade e dependência da estabilidade laboratorial imposta pela FIV (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997) tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina da análise do sêmen bovino. Por essa razão, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de se estabelecer a correlação de cada teste laboratorial ou suas associações com os índices de fertilidade *in vivo*,

buscando-se, dessa maneira, estimar o potencial de fertilidade agregado às amostras seminais.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é a técnica que permite um maior aproveitamento do uso do sémen, permitindo a utilização de reprodutores com alto valor comercial, além do uso do sémen sexado (Faber *et al.*, 2003).

A PIV compreende a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos, a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV), sendo que o início deste processo ocorre com a recuperação dos ovócitos presentes no interior dos folículos.

Para a MIV os ovócitos bovinos são cultivados por um período de 22-24 horas utilizando normalmente como base o meio para cultivo de tecido 199 (TCM 199) com sais de EARLE (Ayoub *et al.*, 1993). Este meio pode ser modificado de acordo com os protocolos de cada laboratório, podendo ter diversas fontes de suplementação energética. Além da composição do meio, outros fatores como pH, osmolaridade, composição iônica, temperatura da estufa tensão de dióxido de carbono e oxigênio são importantes para que a maturação ocorra com sucesso (Knobil *et al.*, 2003).

A etapa seguinte é a FIV, a qual depende, além da qualidade dos ovócitos, da qualidade dos espermatozoides utilizados (Hansen, 2006). Portanto, após a maturação, os ovócitos são expostos aos espermatozoides para que ocorra a fecundação. Neste processo estão envolvidas várias etapas, culminando com a penetração do ovócito pelo espermatozoide e formação de um núcleo diplóide que originará um novo indivíduo (Gonçalves *et al.*, 2001).

Para a FIV, realiza-se inicialmente a seleção dos espermatozoides, com o objetivo de remover o plasma seminal e o crioprotetor e aumentar a concentração de espermatozoides de boa qualidade (Parrish *et al.*, 1995). Além disso, as técnicas de seleção separam os espermatozoides vivos dos mortos, evitando os efeitos deletérios

que os espermatozoides mortos possam exercer. A separação por gradiente de densidade (Percoll) e o método de migração de espermatozoides pelo swim-up são as técnicas mais utilizadas para seleção de espermatozoides viáveis, porém outras técnicas como a lavagem do sémen, também podem ser utilizadas sem afetar o sucesso da FIV. O gradiente de Percoll proporciona uma maior recuperação quando comparado ao *swim-up*, entretanto a qualidade e viabilidade dos espermatozoides recuperados é semelhante em ambos os métodos (Rho *et al.*, 2001).

2.6 Inseminação Artificial na Raça Brava

A reprodução em ganadarias de lide encontra-se condicionada por uma série de fatores que podem afetar as vacas, entre as quais se podem destacar o *stress* derivado do manejo, sanidade e alimentação. Muitas vezes é por esta razão que as técnicas reprodutivas que se aplicam em outras raças de bovinos não dão bons resultados e provocam que o ganadero descarte a sua utilização (Mas *et al.*, 2011).

As ganadarias de lide desenvolveram a sua atividade produtiva, baseando-se nos antigos sistemas de reprodução. As técnicas reprodutivas nesta raça têm um custo elevado mas a adaptação destas explorações à IA apesar de ser um investimento considerável tem também um incremento genético e de melhoramento animal elevado (Peinado, 2006).

Entre os ganaderos existe, na generalidade, uma ideia enganosa sobre IA, no entanto as vantagens que esta acarreta são mais importantes relativamente às desvantagens (Collantes *et al.*, 2009)

2.6.1 Vantagens da Inseminação Artificial na Raça Brava

A IA em bovinos de lide oferece uma melhoria genética da ganadaria, beneficiando em muito o progresso da mesma. A possibilidade de inseminação de vacas com sémen de touros de reconhecida qualidade genética torna esta técnica importante na diversidade da exploração (Peinado, 2006).

Permite a conservação de património genético de sementais com elevado mérito genético, permitindo a preservação dos seus genes após a sua morte. O sémen destes touros pode ser utilizado em netas e bisnetas deste semental, mediante um programa inteligente de “cria em linha”, evitando-se a consanguinidade excessiva (Palma, 2008)

Pode utilizar-se sémen de touros que estão a longas distâncias, já que uma só extração permite o armazenamento de várias doses.

Permite um maior controlo sanitário, já que se podem controlar de forma eficiente, as patologias venéreas (Mas, *et al.*, 2011) Figura

2.6.2 Desvantagens da Inseminação Artificial na Raça Brava

A fertilidade é baixa e os custos desta técnica nesta raça são elevados (Collantes *et al.*, 2009). São as ganadarias que se devem adaptar à técnica e não o contrário, por isso é necessário o controlo da alimentação da sanidade, manejo e formação do pessoal (Peinado, 2006).

Numa ganadaria existe uma percentagem de vacas que apresentam ciclos irregulares ou novilhas com cérvix muito estreito e que não apresentam as características ideais para a IA. Por esta razão é recomendável introduzir um programa de inseminação a tempo fixo (IATF) (Collantes *et al.*, 2011).

Uma fêmea mais nervosa e inquieta que o normal, sem comer relaxadamente, podem ser os poucos sinais possíveis de identificar uma vaca brava em cio. É difícil ter

a percepção deste comportamento no mato. A vaca brava é um animal que procura isolamento e a manifestação de cio é menos exuberante em presença humana (Lima *et al.*, 2014)

2.6.3 Preparação para a Inseminação Artificial em Vacas Bravas

É importante que o lote de vacas bravas a inseminar se habitue durante dias às pessoas que vão estar envolvidas no processo de IA. Geralmente esta equipa é constituída pelo veterinário, ajudante da ganadaria e ganadero. É necessário que os procedimentos sejam efetuados de forma tranquila. (Peinado, 2006) (**Figura 7**)

Preparação:

- Separam-se as vacas a inseminar para um recinto anexo à manga de saneamentos onde se realizará a operação (Peinado, 2006)

- As vacas podem ser imobilizadas por barras transversais para segurança do operador que atravessam a manga por altura do curvilhão (Garrido, 2008);

- Geralmente é introduzida uma vaca mansa á frente para servir de apoio à vaca brava durante a IA (Peinado, 2006).



Figura 7: Procedimento de Inseminação Artificial em gado bravo (Vega *et al.* 2012).

III. Materiais e Métodos

3.1 Recolha dos Testículos e Transporte

Para a realização deste trabalho, um total de seis touros de raça brava com idades entre os 3 e os 8 anos foram abatidos no Matadouro do IAMA de Angra do Heroísmo. Para facilitar os procedimentos laboratoriais e a análise de resultados, a cada touro foi atribuída uma letra da seguinte forma:

Touro A: Touro com nº costado 343;

Touro B: Touro com o nº costado 8;

Touro C: Touro com o nº costado 348;

Touro D: Touro com o nº costado 26;

Touro E: Touro com o nº costado 196;

Touro F: Touro com o nº costado 396;

Os touros foram abatidos por motivos de refugo da manada, em modalidade de abate normal (touros B, D e E) e após lide em praça, em modalidade de abate urgente (touros A, C e F). Após o abate, os testículos foram recolhidos, de acordo com Martins *et al.*, (2007), tendo sido imediatamente colocados em embalagens de plástico e de seguida em caixa termorreguladora (para manutenção da temperatura a 20 °C) e enviados para o laboratório da Universidade dos Açores em Angra o Heroísmo (**Figura 8 e 9**).



Figura 8: Recolha dos testículos em matadouro.



Figura9: Caixa termorreguladora utilizada para a manutenção da temperatura ambiente durante o transporte.

3.2 Recolha do Sémen do Epidídimo

Após a chegada a laboratório os epidídimos foram dissecados e separados dos testículos (**Figura 10**). Isolou-se a cauda do epidídimo, realizando-se vários cortes com pinça e bisturi, até à libertação do esperma que foi diluído em meio "Tris" à temperatura ambiente (**Figuras 11 e 12**). Este diluidor é composto por 200mM Tris (tris(hidroximetil)aminotano) base, 66,7 mM de ácido cítrico, 55,5 mM de frutose, 0,475 g/l de penicilina sódica, 0,8 g/l de sulfato de estreptomicina e 200 ml de gema de ovo por litro de meio contendo e 0,6 M de glicerol (Gibbons, 2002). Cada suspensão de esperma foi isolada dos detritos tecidulares com um tamis e transferidas para um tubo, como descrito por Cormier *et al.*, em 1997.



Figura 10: separação do epidídimo do testículo.



Figura 11: Remoção da cauda do epidídimo onde os espermatozoides são mais maduros.



Figura 12: Incisão e pressão sobre a cauda do epidídimo para libertação do sêmen na solução "Tris".

3.3 Preparação das Palhinhas de Sêmen

Para calcular a concentração de sêmen, foi efetuada uma diluição de 1/100 com água.

A contagem foi feita numa câmara de Neubauer (**Figura 13, 14 e 15**), sendo a usada a seguinte fórmula $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$, em que:

Concentração inicial (C_i) = número de espermatozoides contados $\times 5 \times 10^6$

Vamos usar a seguinte fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

Com C_f = concentração final de espermatozoides que se deve ter na palhinha

V_f = volume final em ml para encher todas as palhinhas

C_i = concentração calculada acima

E V_i = volume de sêmen para recolher

Então $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$

Em seguida, calculamos: $V_f - V_i = V_d$



Figura 13: Câmara de Neubauer utilizada.

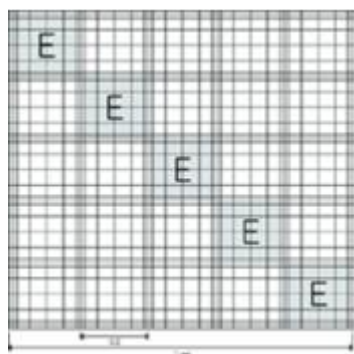


Figura 14: Esquema de contagem de espermatozoides utilizado.

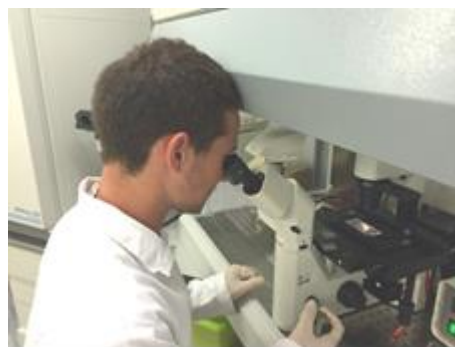


Figura 15: Contagem de espermatozoides no microscópio ótico.

Com V_d , o volume de diluente a ser adicionado ao V_i a um volume final V_f .

Para a preparação das palhinhas 0.25 ml palhinhas “francesas” (i.d.=1.6 mm, IMV. L’Aigle, France), mergulhou-se a parte aberta da mesma, enchendo-se por vácuo. Subsequentemente, foi mergulhada a parte aberta da palhinha em PVA (Polivinilalcohol) para formar um tampão hermético que a selou. (Martinez-Pastor *et al.*, 2005) (**Figuras 16, 17 e 18**).



Figura 16: Aspiração do sémen diluído para as palhinhas



Figura 17: Colocação das palhinhas em suporte para entrada de ar.



Figura 18: Colocação de PVA na extremidade da palhinha aposta à bucha.

3.4 Congelação das Palhinhas de Sémen

As palhinhas foram colocadas em posição horizontal numa caixa de esferovite, que foi posteriormente introduzida num frigorífico à temperatura de 5°C durante 2 horas (para um arrefecimento lento). Depois as palhinhas foram colocadas numa câmara de congelação programada (IceCube 14S; SyLab, Austria) que tinha sido colocada previamente à temperatura de 5 °C (**Figura 19**). A câmara foi, posteriormente arrefecida com uma taxa de - 4 °C / min até -10 °C (fase lenta) seguindo-se a congelação de -10 °C a -145 °C (fase rápida), com uma taxa de -40 °C/min (**Figura 20**). Depois as palhinhas foram, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenados por pelo menos 48 horas antes da sua descongelação (**Figura 21**).



Figura 19: Colocação das palhinhas no interior da câmara de congelação.

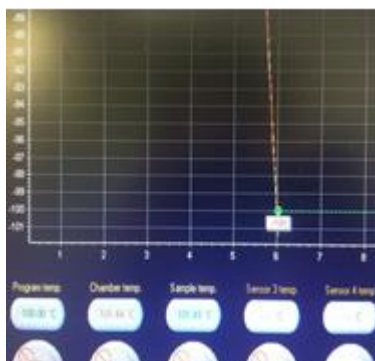


Figura 20: Curva de diminuição da temperatura das palhinhas.



Figura 21: Colocação das palhinhas em azoto líquido após congelação.

3.5 Descongelação das Palhinhas de Sémen

Para a descongelação, mergulhou-se cada a palhinha pelo menos 10 segundos num banho-maria a 37 °C, em seguida cortaram-se ambas as extremidades para recolher de sémen de cada palhinha para análise (Medeiros *et al.*, 2002) (**Figuras 22 e 23**). Por cada touro e por cada teste foram descongeladas 3 palhinhas de sémen congelado.



Figura 22: Retirada das palhinhas do contentor para a descongelação.

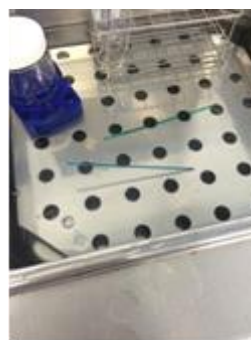


Figura 23: Introdução das palhinhas em banho-maria durante 10 segundos.

3.6 Avaliação da Motilidade Espermática

Esta análise foi realizada usando um microscópio ótico de contraste de fase com a colocação de uma gota de sémen diluído entre lâmina e lamela. A ampliação foi de 200Xs e a placa de aquecimento regulada a uma temperatura 37-38 ° C (**Figura 24**). Examinou-se cinco campos sucessivos de uma preparação, fazendo uma estimativa visual da percentagem de espermatozoides móveis com uma escala de 0-100% (Olivera, 2009).

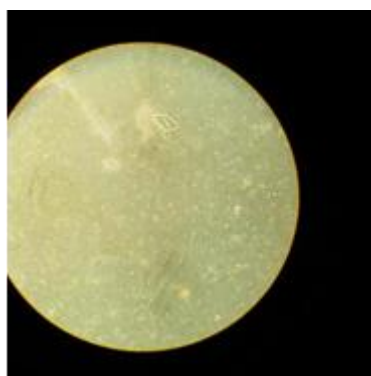


Figura 24: Avaliação da motilidade espermática

3.7 Citometria de fluxo

3.7.1 Avaliação da Integridade da Membrana e Viabilidade Espermática

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada pelo método que foi descrito por Garner e colaboradores em 1986 usando a dupla marcação fluorescente. Assim a percentagem de espermatozoides vivos foi avaliada por citometria de fluxo usando os marcadores SYBR-14 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e PI.

A solução de coloração foi preparada, anteriormente, adicionando-se 5 µl de uma solução de 2 mM de PI (em água) e 2 µl de uma solução de 0.1 mM de SYBR-14 para 2 ml de PBS (Tampão fosfato salino). Antes da análise 295 µl de solução de coloração foi adicionada a 5 µl de sémen (com a concentração final de 1×10^6 células/ml). Depois de 10 minutos de incubação a 37 °C foi efetuada a avaliação por citometria de fluxo com citometro equipado com 15 mW (Becton and Dickinson, San Jose, California USA), recolhendo-se os dados, da dispersão lateral e dianteira modo linear de 10.000 eventos por amostra, a uma taxa de 400-600 eventos/s, em fórmula logarítmica.

A fluorescência do SYBR-14 foi detetada usando um filtro "*band-pass*" FL1 530/30 nm e a fluorescência de PI detetada usando um filtro FL3 650 nm "*long-pass*". Os dados foram analisados usando *software* CellQuest™ (*software* Pro version 4.0.2). Através de inspeção de dados de dispersão de luz, os eventos não-espermáticos ("debris") foram descartados. Foram definidas regiões gráficas a partir das quais as proporções relativas das subpopulações de espermatozoides foram calculadas. A **Figura 25** mostra um exemplo de uma *dot plot*, representando a forma como essas regiões foram definidas, mostrando a população de espermatozoides com alto percentagem de coloração com SYBR-14 e baixo percentagem de coloração com PI (espermatozoides vivos-R1). A população com baixa percentagem de coloração SYBR-14 e alta coloração

de PI, significando espermatozoides mortos aparece como R2. A região R3 indica outras partículas sem interesse que não são células espermáticas (**Figura 25**).

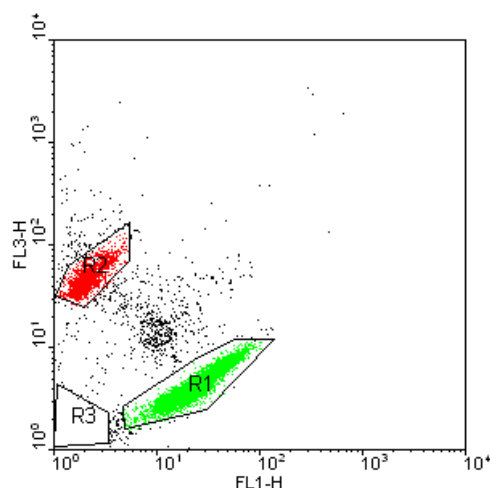


Figura 25: Gráfico típico que mostra a distribuição de citometria de fluxo de eventos e as intensidades de fluorescência de SYBR-14 (FL1-H) e iodeto de propídio (PI) (FL3-A). R1 (espermatozoides vivos), R2 (espermatozoides mortos) e R3 (outros eventos).

2.7.2 Integridade Acrossômica

A avaliação da integridade e estado do acrossoma foi efetuada por coloração das amostras incubadas com PI (como marcador para a viabilidade das células) Garner *et al.*, 1986) e Pisum sativum agglutinin conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) como marcador do estado acrossomal (Casey *et al.*, 1993, Hossain *et al.*, 2011 como descrito por Rathi *et al.* (2001). O FITC-PSA conjugado foi preparado a partir de uma solução de 0,1 mg/ml em PBS sem BSA (Albumina do Soro Bovino), e o PI foi dissolvido em PBS para formar uma solução de 2 mg/ml.

Antes da execução da avaliação, 500µl de sêmen, 30 µl FITC-PSA (0.1 mg/ml) e 2µl de PI (2 mg/ml) foram adicionados. Depois da incubação durante 10 min. a 37 °C, as proporções das marcações FITC-PSA e células coloridas com PI foram quantificadas

a partir de citometria de fluxo de duas cores, usando FacsCalibur (Becton and Dickinson, San Jose, California USA).

A partir da conjugação dos dois fluorocromos, quatro subpopulações de espermatozoides foram identificadas como descrito por Maxwell *et al.* em 1997: espermatozoides vivos com acrossoma intato, sem coloração ao PI e FITC-PSA (R2); espermatozoides vivos com acrossoma danificado, sem coloração ao PI e coloração ao FITC-PSA (R4); espermatozoides mortos com acrossoma intato, coloração ao PI e sem coloração ao FITC-PSA (R3); espermatozoides mortos com acrossoma danificado, coloração ao PI e ao FITC-PSA (R1) (**Figura 26**).

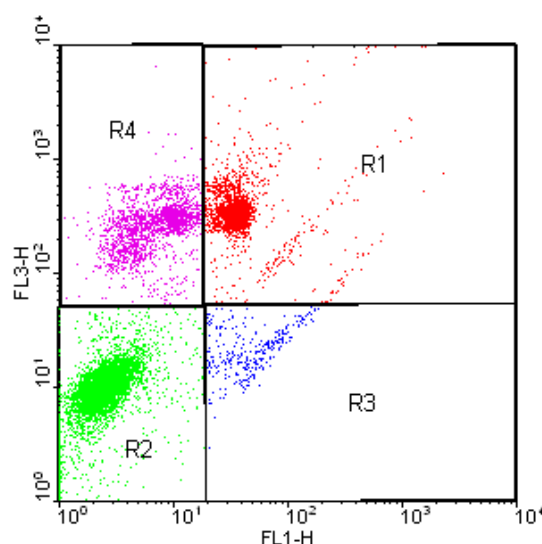


Figura 26: Gráfico típico que mostra a distribuição de citometria de fluxo de eventos e as intensidades de fluorescência do iodeto de propídio e FITC (PI).

3.8 Métodos de Indução / Detecção de cio utilizados

Foram realizadas um total de 14 inseminações artificiais correspondentes à escolha de 14 fêmeas de raça brava utilizando-se três modalidades de inseminação:

- *Inseminação artificial após detecção de sinais de cio natural (Cn).*

Protocolo de inseminação que se a vaca mostrava sinais de cio pela manhã foi inseminada pela tarde do mesmo dia, e a que mostrou sinais de

cio à tarde foi inseminada pela manhã do dia seguinte. Nesta modalidade foram inseminadas 7 vacas;

- *Inseminação artificial introdução do implante vaginal de progestagêneos (CIRD[®]) (ICn) (Cutaia et al., 2001).*

-Introduziu-se o implante vaginal durante 7 dias,

- ao 6º dia pós-introdução do CIRD[®], aplicou-se via intramuscular PGF2α cloprostenol (ESTRUMATE[®]) 2 ml.

-O implante foi removido ao fim de sete dias aguardando-se a manifestação de cio entre os 2º e 5º após retirada do implante. Foi efetuada a IA seguindo o critério anteriormente descrito. Este método foi utilizado em 3 animais;

- *Inseminação artificial a tempo fixo (IATF) com o seguinte protocolo, (Marcantonio, 2007):*

- Dia 0 introdução do implante vaginal de progestagêneos (CIRD[®]) e aplicação intramuscular de GNRH buserelina (RECEPTAL[®]), 2,5 ml;

-Dia 8 aplicação intramuscular da PGF2α, cloprostenol (ESTRUMATE[®]) 2 ml,

-Dia 9 remoção do implante de progestagêneos (CIRD[®]) e aplicação intramuscular de gonadotrofina sérica (INTERGONAN[®]) 500 UI,

- Inseminação às 48 horas e 56 horas após retirada do implante. Nesta modalidade foram beneficiadas 4 vacas bravas.

3.9 Procedimentos de Inseminação e Diagnóstico de Gestação

Fez-se a limpeza do reto da fêmea a ser inseminada. Depois, os órgãos genitais externos e enxugou-se com papel higiênico. De seguida localizou-se o sémen a ser usado no interior do contentor de azoto. Levantou-se a caneca contendo as doses de sémen, e retirou-se com auxílio de uma pinça.

A dose foi descongelada, com a extremidade de algodão voltada para baixo, em água a 37 °C durante 10 segundos. Após esse tempo a palhinha de sémen foi enxuta com papel higiênico e cortada com a lâmina na extremidade oposta à do algodão. Depois foi introduzida no aplicador e inserida pela vulva, passando a vagina e o cérvix descarregando-se uma porção de sémen em cada corno uterino.

Todas as fêmeas inseminadas foram alvo de diagnóstico de gestação aos 60 dias pós inseminação.

3.10 Análise Estatística

Para a análise estatística foi realizada uma análise de variância simples ANOVA, para avaliar os efeitos dos diferentes fatores. Quando a ANOVA revelou um efeito significativo os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey. A diferença de $P < 0.05$ foi considerada significativa. Todas as análises foram efetuadas usando o *software* SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

IV. Resultados

4.1 Resultados dos Testes Laboratoriais

4.1.1 Teste da Motilidade Espermática

A figura 27 representa a motilidade média para cada touro estudado.

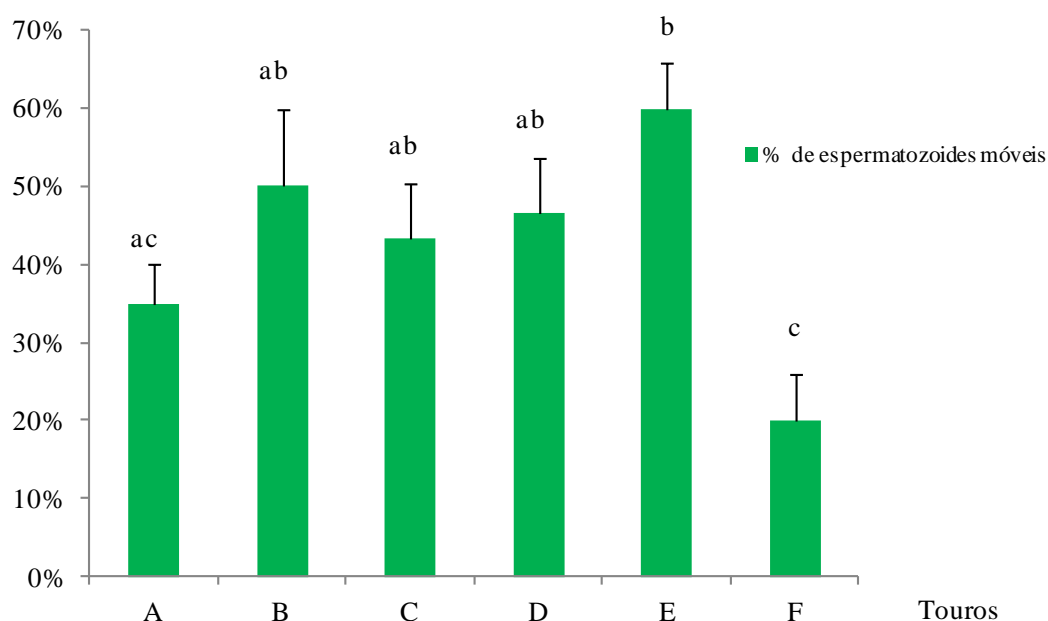


Figura 27: Motilidade espermática para cada touro.

As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ($P < 0.05$) para cada touro estudado.

Observou-se que o touro E apresentou os melhores resultados de motilidade (60%), seguido do touro B (50%). Os touros A, C e D demonstraram uma motilidade que variou de 35 a 45%. Finalmente, o touro F obteve os piores resultados com 20% de motilidade. Apesar de este touro apresentar valores estatisticamente inferiores ($P < 0,05$) aos outros touros em estudo, esta evidência não foi observada na IA. Em média a motilidade dos espermatozoides foi de 57.1%, sendo a média da IA de 50%.

Pode-se também afirmar-se, a partir desta figura, que a motilidade dos espermatozoides, que reflete a qualidade do sêmen, quando comparado com os resultados da IA não tem resultados similares.

4.1.2 Teste de Viabilidade

A figura 28 mostra a percentagem média de espermatozoides vivos, estudada por cada touro.

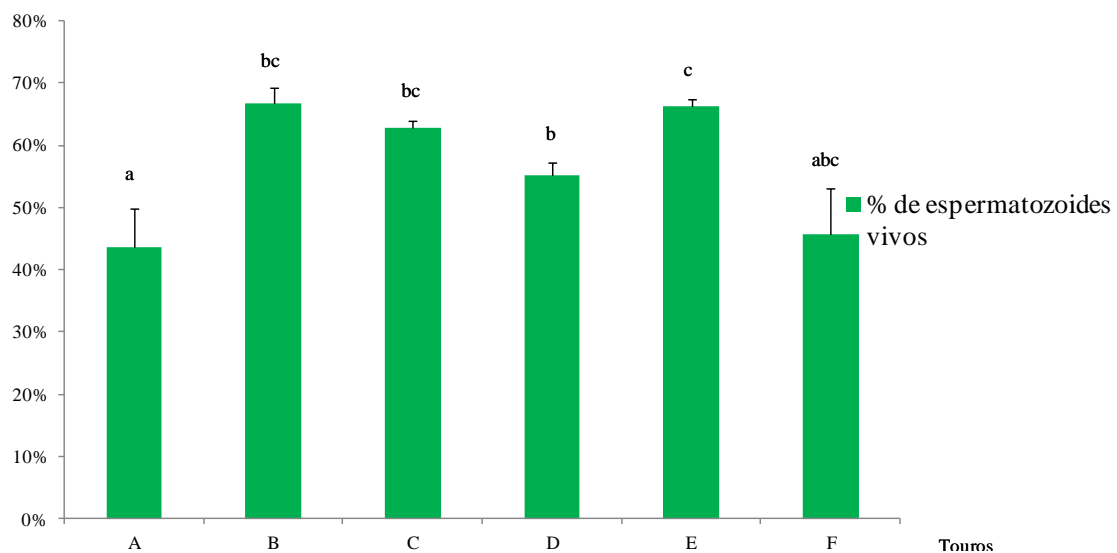


Figura 28: Viabilidade do sêmen de cada touro.

As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ($P < 0.05$) para cada touro estudado.

Podemos observar que os touros B, C e E apresentam a maior viabilidade com cerca de 70%. A viabilidade espermática destes touros é estatisticamente superior à do touro A, sendo o touro E estatisticamente superior aos touros A e D.

Tal como no parâmetro anteriormente analisado, esta viabilidade inferior não se repercutiu no sucesso da IA.

4.1.3 Teste da Integridade Acrossômica

4.1.3.1 Membrana Plasmática e Acrossoma Intatos

Observou-se que os touros B,C,D e E apresentam 40% a 50% dos espermatozoides sem danos na membrana plasmática e acrossoma, enquanto os touros A e F apresentam taxas a rondar os 20% (Figura 29). A percentagem de espermatozoides intatos é consistente com os resultados encontrados para a viabilidade, já que estes dois fatores de análise tiveram resultados semelhantes.

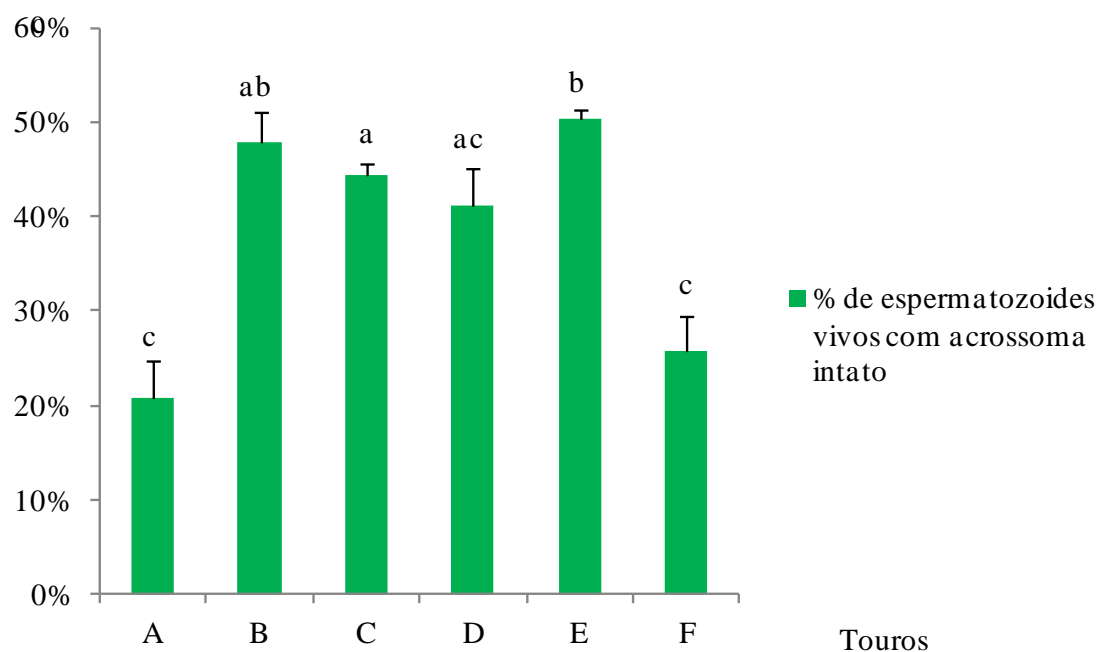


Figura 29: Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma intatos por cada touro.

As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ($P < 0.05$) para cada touro estudado.

4.1.3.2 Membrana Plasmática Intata e Acrossoma Danificado

Podemos ver que todos os touros têm uma percentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e um acrossoma danificado inferior a 10%, não havendo diferenças significativas entre os touros (Figura 30).

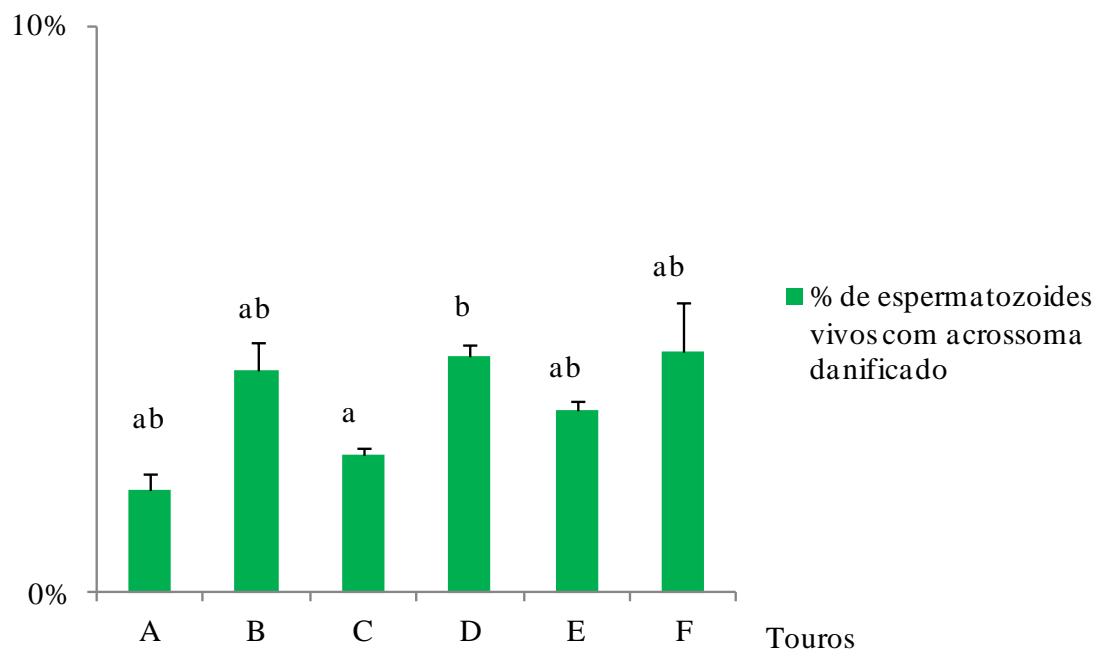


Figura 30: Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e acrossoma danificado por cada touro. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ($P < 0.05$) para cada touro estudado.

4.1.3.3 Membrana Plasmática Danificada e Acrossoma Intato ou Danificado

As análises mostraram que o touro F apresentou cerca de 45% de espermatozoides com a membrana plasmática danificada e acrossoma intacto. O touro C com 35% e touros B e D de cerca de 20%. Os touros A e E cerca de 15%. (Figura 31).

Pela Figura 32, pode observar-se que os touros B, C, D, E e F apresentaram uma percentagem de espermatozoides com membrana plasmática danificada e danos no acrossoma de cerca de 20-30%, enquanto o touro A teve uma população muito maior de danos dos espermatozoides de cerca de 65%.

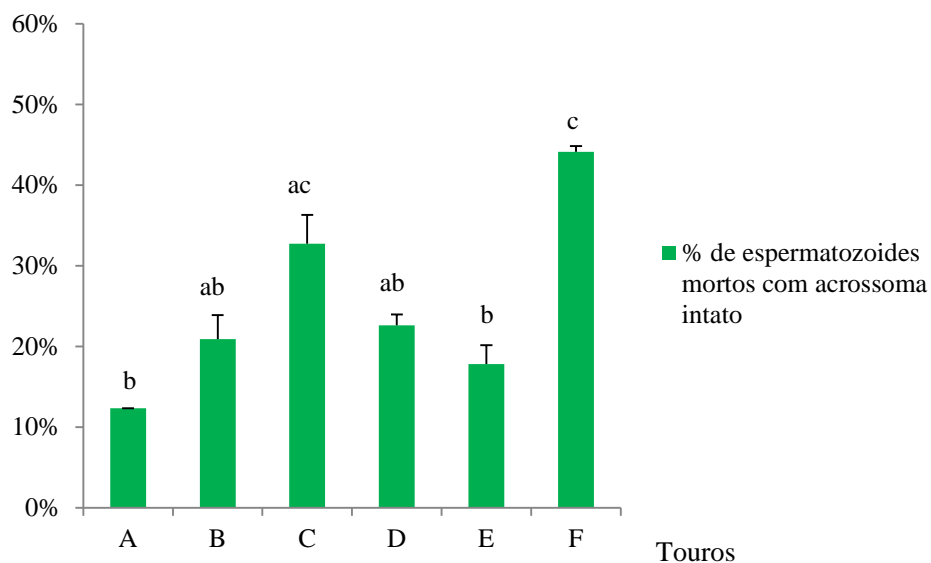


Figura 31: Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática danificada e acrossoma intato por cada touro.

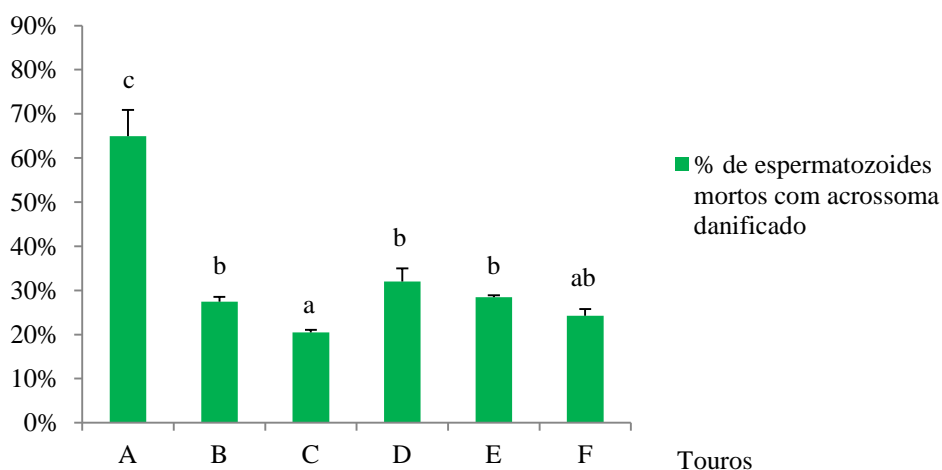


Figura 32: Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma danificado por cada touro. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ($P < 0.05$) para cada touro estudado.

4.2 Resultados da Inseminação Artificial

No quadro 1, podemos avaliar a taxa de sucesso da IA realizada com doses de sémen usado no estudo, a qual, em média foi de 50%.

Quadro 1 :Resultados de IA com doses resultantes da colheita.

*confirmado pós diagnóstico de gestação aos 60 dias.

Código do Touro	Resultado/ Diagnóstico gestação	Método de Indução \ Detecção de cio	Produto
A	POSITIVO	Cn	Fêmea
A	POSITIVO	IATF	Morte materna na exploração*
A	NEGATIVO	IATF	
A	NEGATIVO	Cn	
B	POSITIVO	ICn	fêmea
C	NEGATIVO	Cn	
C	NEGATIVO	IATF	
D	NEGATIVO	Cn	
D	POSITIVO	Cn	Fêmea
E	NEGATIVO	Cn	
E	POSITIVO	IATF	Macho
E	POSITIVO	ICn	fêmea
E	NEGATIVO	Cn	
F	POSITIVO	ICn	Macho

Como podemos observar o sémen de alguns touros foi usado várias vezes, nomeadamente os touros A, C, D e E, enquanto os touros B e F apenas foram utilizados uma vez. Tal fato deve-se à escolha dos proprietários das vacas inseminadas aliadas ao pouco número de vacas disponíveis e ao desempenho dos touros utilizados para a recolha em lide.

Quer para as características do sémen após congelação/descongelação, quer para os resultados de IA, não foram observadas diferenças entre os touros utilizados.

V Discussão

A ejaculação normal contém milhares de milhões de espermatozoides, pelo que a sua diluição é necessária para aumentar o número de doses a utilizar. Esta diluição deve considerar a concentração de pelo menos 10-12 milhões espermatozoides vivos, sabendo que o congelamento provoca uma perda de cerca de 50% dos espermatozoides (Aisen, 2001). Somente nos últimos anos, algumas pesquisas intensificaram o estudo na recuperação e preservação de espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo (Herrera, *et al.*, (2006). Parte deste empenho foi promovido pelo crescente interesse na preservação de espécies ameaçadas de extinção e preservação de células espermáticas de animais de produção com alto valor genético, que por diversas causas perderam a capacidade de reprodução (Papa *et al.*, 2008). A raça brava na Ilha Terceira conta com um efetivo reprodutivo de cerca de 1000 cabeças, daí a necessidade de implementar a IA e a criopreservação de células espermáticas no melhoramento e diversidade genética desta raça de bovinos.

Os espermatozoides colhidos do epidídimo podem ser usados em várias biotecnologias com resultados satisfatórios (Martins *et al.*, 2007). De acordo com Fernández-Santos *et al.*, (2008) os epidídimos têm condições adequadas para prolongar a sobrevivência espermática, uma vez que a cauda do epidídimo providencia condições ambientais ótimas para o armazenamento dos gametas em condições fisiológicas.

A criopreservação de espermatozoides recolhidos de epidídimos causa uma diminuição da motilidade total dos espermatozoides e na percentagem de células espermáticas com membranas e acrossomas intatos (Martins *et al.*, 2007). Os processos de criopreservação afetam também a taxa de fertilidade por dano nas estruturas acrossómicas (Critser *et al.*, 1987). Descongelar o sémen também é um passo fundamental para a sobrevivência, mobilidade e capacidade de fertilizar do sémen

criopreservado. A descongelação rápida das doses é preferida para evitar a possibilidade de recristalização de moléculas de água na palhinha, que podem ser prejudiciais para a IMP (Papa *et al.*, 2008)

Com base nos dados recolhidos foram diferenciados dois grupos de resultados: o primeiro corresponde aos obtidos a partir da análise por microscopia e o segundo corresponde à análise dos espermatozoides efectuada por citometria de fluxo. Pelos resultados obtidos por citometria de fluxo após avaliação do sémen, foi possível identificar os espermatozoides individualizados de partículas de tamanho inferior, sendo posteriormente identificada a fluorescência verde e vermelha apenas da população de espermatozoides. Em relação à motilidade e qualidade do movimento verificou-se neste trabalho que a percentagem de motilidade espermática não afetou a taxa de sucesso na IA. De fato, podemos verificar pelos resultados diferentes, por exemplo, com os touros E e F. O sémen do touro E, que apresentou 60% de motilidade, apresenta resultado negativo na primeira IA enquanto o sémen de touro F, que tem a menor percentagem de motilidade, apresenta um resultado positivo à IA.

Usualmente a motilidade dos espermatozoides é estimada de forma subjetiva através da avaliação visual das células sob microscopia ótica convencional (Arruda *et al.*, 2004; Crespilho *et al.*, 2006) representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de IA (Graham, 2001). Apesar da importância da análise no contexto da avaliação seminal, a relação entre motilidade espermática e fertilidade permanece contraditória, sofrendo grande divergência entre os diferentes trabalhos de pesquisa que apontam índices de correlação variáveis entre 0,15 a 0,83 (Rodríguez-Martínez, 2005). A subjetividade da análise, que depende, sobretudo, da experiência do técnico que conduz o exame, pode ser apontada como principal responsável pela baixa precisão em termos de repetibilidade do teste (Januskauskas *et al.*, 2000), revelando uma baixa

correlação entre motilidade e fertilidade animal. Nesse sentido, variações de 30 a 60% são reportadas na estimativa da motilidade espermática para o mesmo ejaculado quando avaliado subjetivamente (Sozánska *et al.*, 2005; Verstegen, 2002).

Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento entre espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (Verstegen, 2002). Neste trabalho o escasso número de inseminações efetuadas, pode estar na base destes resultados uma vez que seria necessário um maior número de IA para explicitar este aspeto.

A avaliação do movimento espermático, mesmo com o advento e utilização das técnicas computadorizadas, proporciona inconsistente correlação com os índices de concepção animal quando utilizada isoladamente, visto que a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozoides concluam com êxito sua função biológica representada pela fertilização do ovócito (Graham *et al.*, 2005).

Para a viabilidade dos espermatozoides, poderemos afirmar que os touros analisados apresentam valores de viabilidade consideráveis. Desta forma, estamos perante uma alta taxa de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma, e taxas mais baixas de espermatozoides com membrana plasmática intacta e um acrossoma danificado. Além disso a maioria dos espermatozoides com membrana plasmática danificada possuem acrossoma intato. Todos estes fatores resultam a favor de uma boa taxa de sucesso à IA.

A redução da fertilidade, associada IA com sémen criopreservado, vem sendo atribuída aos processos ocorridos durante a congelação do sémen, onde cerca de 10 a

50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem a este processo e morrem (Watson, 2000).

A análise da viabilidade espermática mediante microscopia é um método no qual se torna necessário o emprego de algum tempo na contagem individualizada dos espermatozoides (Moreira da Silva *et al.*, 2006). Deste modo avaliou-se a viabilidade e a integridade das membranas plasmáticas e acrossômica por citometria de fluxo.

A adição de PI à FITC-PSA permite a determinação simultânea da viabilidade e integridade do acrossoma dos espermatozoides, uma vez que o Propídio Iodado emite fluorescência vermelha e a FITC-PSA emite fluorescência verde (Harrison *et al.*, 1993).

Podemos observar, neste trabalho, que motilidade, viabilidade e acrossoma são fatores que estão interligados tendo em conta a qualidade do sémen. O sémen analisado tem uma elevada percentagem de motilidade, e a viabilidade e a percentagem de espermatozoides com acrossoma e membrana plasmática íntegra é também elevada, e vice-versa, se a taxa de motilidade é baixa, uma vez que estes fatores estão intimamente ligados. Nestas condições observamos que a conservação de sémen feita neste trabalho permite a obtenção de doses de sémen de qualidade de qualquer um dos touros. Atingem-se taxas de cerca de 50% de espermatozoides intatos (touro E), enquanto que as taxas mais baixas se situam ao nível de 20% para o touro B. A percentagem de espermatozoides viáveis numa amostra seminal pode ser definida pelo número de células que exibem estabilidade e integridade de membrana plasmática (Graham, 2001). A IMP é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gâmetas promovendo uma fecundação (Vazquez *et al.*, 1993).

Relativamente aos resultados da IA que apenas o touro C não conseguiu, gerar uma gestação durante este trabalho. Contudo o reduzido número de IA realizadas e os vários fatores que determinam o sucesso da taxa de IA podem ter condicionado estes resultados.

Como os espermatozoides representam células complexas que dependem da funcionalidade de múltiplos atributos para exercerem seu papel natural na reprodução, ocorrem falhas nos métodos avaliação, observam-se, geralmente, correlações baixas ou variáveis entre os padrões de qualidade das amostras seminais e os índices de fertilidade alcançados nos programas de IA em bovinos (Collantes *et al.*, 2009). No entanto, uma previsão laboratorial para os índices de concepção observados no campo representa uma barreira de difícil transposição, envolvendo diversos fatores inerentes ao reprodutor (genótipo, idade, lide ou não lide), às fêmeas bovinas (deteção de cio, protocolo de sincronização de estro, condição corporal, inseminador).

A IA em bovinos de raça brava não é uma técnica fácil; são animais pouco acostumados à manipulação humana e como tal com tendência a *stress*. Uma sucessão de estímulos de *stress* aumenta a atividade da adrenal em bovinos com aumento dos níveis de cortisol plasmático e glucose (Tarrant *et al.*, 1979). Sanchez *et al.* (1996) observaram que todas as manipulações experimentais em gado bravo provocavam aumentos substanciais de cortisol sanguíneo em relação ao nível basal. Moberg (1985) sugeriu que concentrações de cortisol sanguíneo, como resposta fisiológica ao *stress*, têm implicações na reprodução e no sistema imunitário.

O presente trabalho foi pioneiro na Ilha Terceira e a falta de instalações adequadas à IA em gado bravo, a pouca frequência de manejo reprodutivo desta raça, bem como o técnico que efetuou a IA, pode ter tido implicações na taxa de fertilidade conseguida à IA. A taxa de sucesso obtida à IA foi de 50% sendo semelhante à obtida

por Vega *et al.* em 2012, na mesma raça de bovinos, que apresentaram taxas entre os 40 e 60% para diversos métodos de sincronização de cios.

O método de detecção de cios sem indução (Cn) foi o mais utilizado, com uma taxa de sucesso de 42%, isto pode ser explicado pois a utilização de protocolos de indução de cios hormonais causam uma redução na taxa de concepção *in vivo* (Marcantonio, 2007). A escolha de cio natural deveu-se sobretudo ao reduzido custo que apresenta e que permite que as vacas sejam manipuladas apenas uma vez colmatando as deficientes instalações nas ganadarias locais para a realização deste trabalho.

Outra condicionante apresentada nesta técnica prende-se com o fato de nem todas as vacas propostas para a IA terem uma condição corporal adequada ao comportamento sexual fisiológico normal, sendo no entanto aconselhado um programa de alimentação adequado para a obtenção de bons resultados. Vega *et al.*, (2012) afirma que é um problema acrescido que as vacas bravas a inseminar não possuam uma condição corporal adequada aquando do início dos protocolos de sincronização nesta raça.

VI Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho pode-se inferir que a recolha de sémen do epidídimo, em touros de raça brava *post-mortem*, possui capacidade fecundante podendo ser usado em IA. Esta forma de recolha de sémen pode ser importante para a manutenção do potencial genético de touros bravos que apresentem bons comportamentos, nomeadamente após a lide em praça. A perda destes animais, de forma abrupta, no efetivo reprodutor das ganadarias pode de alguma forma ser minimizada com o uso desta metodologia. Algumas ganadarias na Ilha Terceira debatem-se com uma alta incidência de paratuberculose, esta patologia causa inúmeras perdas de animais de raça brava nos efetivos reprodutores. A recolha de sémen a partir do epidídimo em animais de raça brava que apresentarem mortalidade a esta patologia pode ser significativa, uma vez que não há, até à data referências bibliográficas que a mesma se transmita a partir do sémen.

Não se observaram diferenças na qualidade do sémen em laboratório ou nos resultados da IA quando os animais foram corridos em praça e depois abatidos ou abatidos em matadouro por decisão do ganadero (refugo do efetivo). O esforço físico desempenhado pelos touros durante a lide poderia supor significativas alterações na qualidade do sémen em laboratório e na capacidade fecundante à IA. Para reafirmar este aspeto serão necessários estudos que incluam maior número de amostras e que tenham em conta o padrão hormonal dos animais antes e após a lide.

Com este trabalho podemos observar que há aplicabilidade no uso de IA na raça brava. Os efeitos da melhoria genética que se consegue utilizando as técnicas de reprodução assistida, à semelhança do que acontece em outras raças bovinas, têm paralelo na raça bovina brava, no entanto há vários aspetos que especificam a utilização desta técnica nestes animais.

A IA é melhor aplicada às ganadarias quando estas se adaptam a programas de controlo alimentar, sanitário e de manejo. Pode concluir-se que o correto manejo e as instalações adequadas são fundamentais ao sucesso desta técnica. Além da melhoria das instalações, há que garantir a formação e sensibilização dos proprietários destes animais na abordagem desta técnica, pois a reprodução da raça brava foi desde sempre efetuada por monta natural.

É importante conhecer as alterações hormonais, o momento de ovulação, métodos de sincronização específicos, etc. Há a necessidade de se desenvolver trabalhos nesta área que permitam uniformizar estes critérios neste tipo de raça bovina.

Para a implementação desta técnica, de forma mais comum, há que prever junto das autoridades oficiais o registo dos animais nascidos no registo zootécnico da raça brava dos açores. Como a IA na raça brava dos Açores, apenas começou a ser efetuada com este trabalho foi uma questão que surgiu como passível de resolução.

A realização de mais estudos, no que diz respeito à reprodução da raça brava, será fundamental para ampliar a informação existente. A maior parte da informação diz respeito a raças de carne e de leite com algumas metodologias que não se aplicam à raça brava, devido à sua singular anatomia, fisiologia, comportamento e manejo.

VII. Bibliografia

- Aisen, E.G. (2001). Criopreservación de semen ovino: Efecto de diluyentes hipertônicos sobre la integridad espermática. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -Universidade de Buenos Aires, 120 p
- Amman, M.; Hammerstedt, R.H. (1993). *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology*, 23:317-325
- Anel, L.; Gerra, C.; Alvarez, M.; Martinez, A.F.; Boixo, C.J.; Kaabi, M.; Herraez, P.; Paz, P. (2002). Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology*, 57:577
- Arruda, R.P.; Bali, B.A.; Gravance, C.G.; Liu, I.K.M. (2003). Avaliação dos efeitos diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Scientiae*, 31:228-229
- Arruda, R.P.; Petterson, M. (2004). Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. 1., 2004, Londrina. Anais... Londrina, Brasil, 166-179 pp
- Ax, R.L.; Dally, M.; Didion, B.A.; Lenz, R.W.; Love, C.C.; Varner, D.D.; Hafez, B.; Bellin, M.E. (2004). *Reprodução Animal*. 7ed. Manole. São Paulo. 369-394 pp
- Ayala, J.C.F. (2007). Criopreservación de semen tomado del epidídimo. *Biotechnologia Reproductiva y Transferencia de Embriones bovinos*. Universidad de Tolima. Colombia. 232-237 pp
- Ayoub, M.A.; Hunter, A.G. (1993). Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Journal of Dairy Science*, 76: 95-100

- Baker, S.S.; Thomas, M.; Thaler, C.D. (2004). Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *Journal of Andrology*, 25:744-751
- Barrios, D.A. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides da cauda do epidídimo de toros Post-mortem. IX Congresso venezolano de Producción e Industria Animal. Valera
- Barth, A.D.; Oko, R.J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ed. Ames, Iowa: Iowa State University, press. 285 p.
- Bedford, J.M. (1994). The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction*. 9:2187-2199
- Bilgili, S.F.; Renden, J.A. (1984). Fluorometric determination of avian sperm viability and concentration. *Poultry Science*, 63:2275-2277
- Bloom, E. (1950). Interpretation of spermatic cytology in bulls. *Fertility and Sterility*, 1:233-238
- Botelho, J.B.C. (2000). Ganadaria Rego Botelho. *Revista Festa na Ilha nº4* p.22-23, 60 pp
- Brito, L.F.C.; Barth, A.D.; Bilodeau-Goeseel, S.; Panich, P.L.; Kastelic, J.P. (2003). Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, 60:1539-1551
- Bruemmer, J.M. (2006) Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 22:677-682
- Bruges, A. (1997). O Toiro na Ilha Terceira-Breve nota sobre a sua aparição e evolução. *Revista Festa na Ilha nº1* p. 6-7, 48 pp
- Buxadé, C.C. (1996). *Zootecnia-Bases de Produccion animal: producciones equinas y de ganado de lidia*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 247-260 pp

- Caballero, J.R. (2001). Parámetros Reproductivos de las vacadas de lidia. Mundo Ganadero nº 133. 50-52 pp
- Casey, P.J.; Hillman, R.B.; Robertson, K.R.; Yudin, A.I.; Liu, I.K.M.; Drobnis, E.Z. (1993). Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology*, 14:289-297
- Casey, PJ; Hillman, RB; Robertson, KR; Yudin, AI; Liu, I.K.M.; Robnis, E.Z. (1993). Validation of an Acrosomal Stain for Equine Sperm That Differentiates between Living and Dead Sperm. *Journal of Andrology*, 14: 289-297.
- Celeghini, E.C.C. (2005). Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Tese de doutoramento.
- Chacón, J.; Kaiser, L. (2001). Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. *Reproduction in Domestic Animals*, 36:91-99
- Collantes, R.P.; Telles, H.J.R.(2009).Reproducción Assistida em Ganado de Lidia, *Salud Animal. Asociacion Nacional de Ganaderias Mexicanas de Lidia*. México DF. 35-39
- Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bayley, J.L. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Andrology Journal*, 18:461-468
- Correia, P.B.C. (2012). Posicionamento genético do gado bravo da Ilha Terceira em relação à raça brava de lide. Dissertação (mestrado em engenharia zootécnica). Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo. 2 pp

- Cox, J.F.; Alfaro, V.; Montenegro, V.; Rodriguez-Martinez, H. (2006). Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, 66:860-867
- Crespilho, A.M.; Landim-Alverenga, F.C.; Papa, F.O. (2006). Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. *Ciência Rural*, 5:1507-1510
- Critser, J.K.; Arneson, B.W.; Aaker, D.V.; Huse-Benda, A.R.; Rail, C.D. (1987). Cryopreservation of human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil. Steril.* 47:980-984.
- Cutaia, L.; Moreno, D.; Villata, M.L.; Bó, G.A. (2001). Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*; 55:408
- De Leeuw, A.M.; Den Daas, J.H.G.; Woelders, H. (1991). The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12:112-118
- De Pauw, I.M.C.; Van Soom, A.; Mintiens, K.; Verberckmoes, S.; Kruif, A. (2003). In Vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. *Theriogenology*, 59:1093-1107
- Dejarnette, M.; Nebel, Ray (2006). Anatomía y Fisiología de la Reproduccion Bovina. *Select Reprodutive Solutions* nº8. 6-10 pp
- Dentinho, T. (1998). “Os Toiros”- Contributo para o estudo de efeitos das touradas no desenvolvimento regional sustentável. *Revista Festa na Ilha* nº 2 p. 50-51, 60 pp
- Dias, F.R.M. (2002). Os matos da Terceira e os Toiro- Reflexões sobre gestão e proteção da paisagem. *Revista Festa na Ilha* nº6 p. 20-22, 63pp
- Domecq, J.P.S. (2009). *Del Toreo a La Bravura*. Alianza Editorial, Madrid. 15- 50 pp

- Dyce, K. M.; Sack, W. O.; Wensing C.J.G. (2007). Anatomia Veterinaria. Ed. Manual Moderno. México D.F. 186-190 pp
- Faber, D.C.; Molina, J.A.; Ohlrichs, C.L.; vander zwaag, D.F.; Ferre, L.B. (2003). Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, 59:125-138
- Farrel, P.B.; Presicce, G.A.; Brockett, C.C.; Foote, R.H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49:871-879
- Fernández-Santos, M.R.; Martínez-Pastor, F.; Matias, D.; Domínguez-Rebolledo, A.E.; Estes, M.C.; Montoro, V.; Garde, J.J. (2008). Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 10:1016
- Ferrão, F.R.; Bastos, F. (2010). Recuperação e avaliação de espermatozoides obtidos de epidídimos bovinos resfriados por diferentes períodos. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Brasília
- Galina, C.; Valencia J. (2006). Colección del semen bovino. Reproduccion de Animales Domésticos. 2 ed. Noeriga editores. México D.F.
- Garcia, I. (1991). Estudio del intervalo de partos en La Raza de Lidia. Archivos de Zootecnia nº 40. Facultad Veterinaria de Córdoba. Córdoba 317-325 pp
- Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A.; Pace, M.M. (1986). Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34:127-138
- Garner, D.L.; Thomas, A.C.; Gravance, C.G. (1999). The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 34:399-404

- Garner, D.L.; Thomas, C.A.; Joerg, H.W.; Dejanette, J.M.; Marshall, C.E. (1997). Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 57:1401-1406
- Garrido, J.L.P. (2008). *El Toro Bravo En el Campo*. Almuzara, Córdoba. 19-26 pp
- Garrido, J.L.P. (2012). *El Toro Bravo Ganaderías Míticas*. Almuzara, Córdoba. 26-32 pp
- Gibbons, A. (2002). Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. *Revista Taurus*, 16:24-32
- Gillan, L.; Kroetsch, T.; Chis, W.M.; Evans, G. (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, 103: 201-214.
- Ginther, O.J.; Beg, M. A.; Donadeu, F.X., Bergfelt, D.R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*, 78: 239-257
- Gonçalves, P.B.D.; Visintin, J.A.; Oliveira, M.A.L.; Montanger, M.M.; Costa, L.F.S. (2001). Produção in vitro de embriões. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*.: Livraria Varela, 1 ed, São Paulo 195-226 pp
- González, C.E.; Dúran, C.;Dominguez, C.J. (1995). La inseminacion artificial en ganado de lidia. II Congresso Mundial de Criadores de Toros de Lidia. Sevilla
- Goovaerts, I.G.F.; Hoflack, G.G.; Van Soom, A.; Dewulf, J.; Nichi, M.; Kruif, A.; Bols, P.E.J. (2006). *Theriogenology*. 66:323-330
- Graham, J.K.; Kunze, E.; Hammersted, R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction* 43:55-64

Graham, J.K.; Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64:492-504

Graham; J.K. (2001) Assessment of sperm quality. *AAEP Proceedings*, 47:302-305

Granemann, L.C.; Weiss, R.R.; Kozicki, L.E.; Murádas P.R.; Treml, T.E. (2006); Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epididimo. *Archives of Veterinary Science*, 11:73-77

Gutierrez-Adán, A.; Lonergan, P.; Rizos, D.; Ward, F.A.; Boland, M.P.; Pintado, B.; La Fuente, J. (2000). Effect of the in vitro culture system of the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 55:1117-1126

Hafez, E.S.E; Hafez B. (2000). *Reproducción e Inseminación*, 7 ed. Mc Graw Hill. U.S.A. 101-105 pp

Halangk, W.; Frank, K.; Bohnensack, R. (1984). Determination of the quantity of intact spermatozoa in bull ejaculates. *Archiv Experimentelle Veterinarmedizin*, 38:105-114

Hancock, J.L.A. (1951). Staining technique for the study of temperature-shock in semen, *Nature*, 24:323-324.

Hansen, P.J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. *Theriogenology*, 65:119-125

Harrison, R.A.P.; Asworth, P.J.C.; Miller, N.G.A. (1993). Rapid effects of bicarbonate/CO₂ on boar spermatozoa detected by merocyanine, a probe of lipid packing. *Journal of Reproduction and Fertility - Abstract Series* 12, 14.

Herrera, C.; Miragaya, H.M.; Conde, P.; Hynes, V.; Losinno, L.; Quintans, C. (2006). Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thaw epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 94:299-302.

Hossain, M.S.; Johannisson, A.; Siqueira, A.P.; Wallgren, M.; Rodriguez-Martinez, H. (2011). Spermatozoa in the sperm-peak-fraction of the boar ejaculate show a lower flow of Ca²⁺ under capacitation conditions post-thaw which might account for their higher membrane stability after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 128: 37-44.

Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Rodriguez-Martinez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60:743-758

Januskauskas, A.; Zilinskas, H. (2000). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52:641-658

Jeyedran, R.S.; Van Der Ven, H.H.; Perez-Pelaez M.; Crabo, B.G.; Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:219-228 1984.

Kikuchi, K.; Nagai, T.; Kashiwazaki, N.; Ikeda, H.; Noguchi, J.; Shimada, A.; Soloy, E.; Kaneko, H. (1998). Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymis stored at 4°C. *Theriogenology*, 50:615-623

Knobil, E.; Neil J.D. (2003). *Encyclopedia of Reproduction*. M-Pri editors. San Diego California. 539-545 pp

Konig, H.E.; Liebich, H.G. (2002). *Anatomia de los Animales Domesticos* 2 ed. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 119-134 pp

Langerlöf, N. (1934). Morphological Studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 19:245-266

- Lima, J.P.; Vieira, J.E. (2014). Ilha Terceira: O Lugar Atlântico do Toiro. Bluedições, Ilha Terceira. 53-73pp
- Lonergan, P.; Kommisrud, E.; Adresen, O.; Refsdal, A.O.; Farstad, W. (1994). Use of sémen from a bull heterozygous for the translocation in na IVF program. *Theriogenology*, 41:1379-1384
- Lucas, A.V. (2012). Origem e evolução do toiro de lide em Portugal. *Contra-Barreira*, revista de equitação e tauromaquia nº 26, 26-27 pp
- Marcantonio, S. (2007). Inseminación a Tiempo Fijo.-El Molino, Argentina
- Martinez-Pastor, F.; Guerra, C.; Kaabi, M.; Diaz, A.R.; Anel, E.; Herraéz, P.; Paz, P.; Anel, L. (2005). Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time, *Theriogenology* 44:859-869
- Martins, C.F.; Rumpf, R.; Pereira, D.C.; Dode, M.N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animal and its use *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction Science*, 101:326-331
- Martins, M.I.M.; Justino, R.C.; Pereira F.D.; Perches, C.S.; Chirinéa, V.H.; Lopes, M.D. (2006). The effect of two solutions in the morphological Characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epididimys of dogs and cats. *Animal Reproduction*. 3:265
- Mas, A.; Sanes, J.M.; Martínez-Gomariz, F.; Diego, R.; Vallejo, P.; Seva, J.I. (2011). Protocolos de Sincronizacion de celo en vacas de lidia com monta natural. *Anatomia Veterinaria* 27:93-99
- Maxwell, W.M. and Johnson, L.A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48: 209-219.
- Medeiros, C.M.O.; Forrell, F.; Oliveira, A.T.D.; Rodriguez, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?, *Theriogenology*, 57:34-327

- Mihm, M.; Bleach, E.C.L. (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Sciences*, 78:217–237
- Moberg, G.P. (1985) Biological response to stress. *Animal Stress*. Maryland: American Physiological Society, 27-49 pp
- Mocé, E.; Graham, J.K.; Schenck, J.L. (2006). Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, 66:929-936
- Montesinos, A. (1992). Análisis Estructural de la producción y comercialización del Toro de Lidia en España. Tesis Doctoral. Madrid.
- Moreira da Silva, F.; Metelo, R; Santos, P.; Chaveiro, A. (2006). Avaliação da viabilidade do sêmen de varrascos por citometria de fluxo. *Revista portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101:77-81
- Mortimer, S.T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mamals. *Human Reproduction Update*, 5:403-439
- Muradás, P.R.; Weiss, R.R.; Kozicki, L.E.; Granemann, L.C.; Santos, I.W.; Pimpão, C.T. (2006). Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides bovinos colhidos por lavagem artificial e lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of veterinary science*. 11:69-74
- Norman, A.W.; Litwack, G. (1997). *Hormones* 2nd End. Academic Press. Washington
- Olivera, J.N.A. (2009). Manual de Evaluación de Semen en Bovinos. Facultad de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz. 7-25 pp
- Pal, S.K.; Mandal, D.; Bhattacharyya, K. (1998). Photophysical process of ethidium bromide in micelles and reverse micelles. *Journal of Physical and Chemical*, 102:11017-11023

- Palma, G.A. (2008). Biotecnología de la Reproducción. 2º edición. Ed. ReproEd. Biotec. Mar del Plata – Buenos Aires. 120-126 pp
- Papa, F.O.; Melo, C.M.; Fioratti, E.G.; Dell'Aqua Jr., J.A.; Zahn, F.S.; Alvarenga; M.A. (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 107:293-301.
- Parker, R.; Mathis, C. (2013). Reproductive Tract Anatomy and Physiology of the Cow. Consumer and Environmental Sciences. New Mexico State University. 210-220 pp
- Parrish, J.J.; Krogenaes, A.; Susko-Parrish, J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44: 859-869
- Peinado, A.G. (2006). Problemática de la aplicación de las técnicas de inseminación artificial en ganado vacuno de lidia. Equipo nº 1. A Asociación de Ganaderías de Lidia.
- Pezzone, N. (2013). Reproducción Bovina. Cirugía de ganado bovino. Intertaga. Buenos Aires 326-332 pp
- Prange, R.W.; Duby, R.T. (1998). Dairy Integrated Reproductive Management. University of Massachusetts ediciones. 1-5 pp
- Rao, A.R. (1971) Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tracts in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Thesis. Royal Veterinary College of Stockholm
- Rathi, R; Colenbrander, B; Bevers, M.M.; Gadella, B.M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 65: 462-470.

- Rho, G.J.; Hahnel, A.C.; Betteridge, K.J. (2001). Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*, 56:503-516
- Rodríguez-Martínez, H. (2005). Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, Goiânia. *Anais: Palestra*. Goiânia: Goiás, 2005.
- Rodriguez-Martinez, H.; Larsson, B.; Pertoft, H. (1997). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development*, 9:297-308
- Saacke, R.G.; Dalton, J.C.; Nadir, R.L.; Nebel, J.H.; Bame, J.H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*, 60:663-677
- Saacke, R.G.; Nadir, R.L.; Nebel, J.H. (1990). Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41:45- 60
- Sanchez, J.M.; Castro, M. J.; Alonso, E.M.; Gaudioso, V.R. (1996). Adaptive Metabolic Responses in Females of Fighting Breed Submitted to Different Sequences of Stress Stimuli. *Physiology and Behavior*, 60:1047-1052
- Schlegel, P.N. (1999). Testicular sperm extraction: Microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Human Reproduction*, 14:131-135
- Segovia, M.; Jenkins, J.A.; Paniagua-chavez, C.; Tiersch, T.R. (2000). Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, 53:1489-1499

- Sharma, R.K.; Padron, O.F.; Thomas, A.J.; Agarwal, A. (2007). Factors associated with quality before and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *Fertil steril*, 68:626-631
- Sozńska, A.; Tardif, A.L. (2005). Simple optical method of qualitative assessment of sperm motility: preliminary results. *AAEP Proceedings*, 59:176-184
- Stradaoli, G.; Sylla, L.; Monaci, M.; Maiorino, M. (2009). Phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. *Theriogenology*, 72:91-98.
- Suarez, S.S.; Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproduction tract. *Human Reproduction Update*, 12:1-2
- Tarrant, P.V.; McVeigh, J.M. (1979) The effect of skeletal muscle needle biopsy on blood constituents, muscle glycogen and heart rate of cattle. *Veterinary Sciences*, 27:325-328
- Thomas, C.A.; Garner, D.L.; Dejanette, J.M.; Marshall, C.E. (1997). Fluorometric assessment of acrossomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 56:991-998
- Tiplady, C.A.; Morris, L.H.A.; Allen, W.R. (2002). Stallion epididymal spermatozoa: Pre-freeze and post-thawed mobility and viability after three treatments. *Theriogenology*, 58:225-228
- Tittarelli, C.; Savignone C.A.; Arnaudín, E.; Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A.; Sota, R.L. (2006). Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*. 66:1637-1640

- Vazquez, J.M.; Martinez, E.; Roca, J.; Coy, P.; Pastor, L.M. (1993). Acrossome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 84-88
- Vazquez, J.M.; Martinez, E.; Roca, J.; Coy, P.; Pastor, L.M. (1993). Acrossome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 84-88
- Vega, A.M.; Blanco, J.B.; Esteban, E.R.; Criado, F.G. (2012). La Sincronización de celo y ovulación un método adecuado para la inseminación del ganado de lidia. *Monge Veterinários*, Madrid.
- Verstegen, J. (2002). Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Prattice. *Theriogenology*, 57: 149-179
- Viard, A. (2010). Los últimos Veráguas. *Revista Tierras Taurinas* nº 1 p. 6-7, 48 pp
- Walters, A.H.; Eyestone, W.E.; Saacke, R.G.; Pearson, R.E.; Gwazdauskas, F.C. (2006). Assesement of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after termal insulation of the testis. *Theriogenology*, 65:1016-1028
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61:481-92
- Wilson, H.R.; Warnick, A.C.; Gutierrez, J.H. (1969). Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. *Poultry Science*, 48:714-717